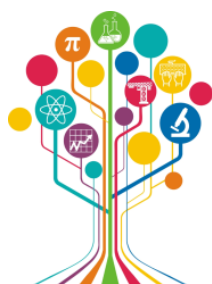


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

Сборник научных трудов
XX Международной конференции студентов, аспирантов
и молодых ученых

25–28 апреля 2023 г.

PROSPECTS OF FUNDAMENTAL SCIENCES DEVELOPMENT

Volume 4. Biology and fundamental medicine

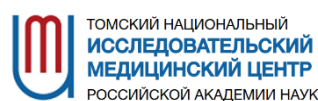
Abstracts

XX International Conference of students, graduate students
and young scientists

April 25–28, 2023



Национальный
исследовательский
**Томский
государственный
университет**



Томск 2023

УДК 501:004(063)
ББК 72:32.81л0
П27

П27 **Перспективы развития фундаментальных наук** : сборник трудов XX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Томск, 25–28 апреля 2023 г.) : в 7 томах. Том 4. Биология и фундаментальная медицина / под ред. И.А. Курзиной, Г.А. Вороновой. – Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2023. – 147 с.

ISBN 978-5-4387-1140-7 (т. 4)

ISBN 978-5-4387-1136-0

Сборник содержит труды участников XX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспективы развития фундаментальных наук», представленные на секции «Биология и фундаментальная медицина».

Предназначен для студентов, аспирантов, молодых ученых и преподавателей, специализирующихся в области анатомии и физиологии, иммунологии, неврологии и психиатрии, клеточной биологии и гистологии, генетики, биохимии и молекулярной биологии, микробиологии и вирусологии, биофизики, биотехнологии, биоинженерии, фармакологии и фармакогнозии, кибернетики и биоинформатики, а также биоматериалов: исследований *in vitro* и *in vivo*.

УДК 501:004(063)
ББК 72:32.81л0

Редакционная коллегия

И.А. Курзина, доктор физико-математических наук, доцент;
Г.А. Воронова, кандидат химических наук, доцент;
С.А. Поробова.

ISBN 978-5-4387-1140-7 (т. 4)
ISBN 978-5-4387-1136-0

© ФГАОУ ВО НИ ТПУ, 2023

Tomsk International Science Program (TISP) «Molecular engineering»



The program is related to biological systems engineering. With the application of the concepts and methods of biology (and, secondly, physics, chemistry, mathematics and computer science) to solve actual problems related to the sciences of living organisms or their applications, using analytical and synthetic methodologies of engineering. Biological engineering mainly uses the rapidly developing field of molecular biology and chemoinformatics to study and develop the applications of living organisms.

Studying under this educational program is carried out in the form of full-time studying, including online studying and distance learning technologies. The program is based on problem-based learning (PBL) approach, which is more effective than traditional way of education. Students will actively acquire knowledge and skills needed for your career prospects, your future. With PBL, students are solving complex, interdisciplinary and real-life academic problems.

Full-time form of education

Duration of study - 4 years

Areas of professional activity: healthcare, food industry, chemical, chemical-technological production, cross-cutting professional activities in industry

Study language - English

Tuition fees: 289,510 rubles a year

Admission exams: 2 exams, of which mathematics (mandatory) and a choice of chemistry, physics or computer science. Taking exams online from January to August 2022

Program Application Deadlines: January 10 - August 20, 2022. Application Link <https://admissions.tsu.ru/>

Objective of the program: Training of a specialist in the field of molecular engineering, capable of conducting applied research focused on development for a specific task of the enterprise. The program is aimed at training specialists with good mathematical, chemical, biological and IT fundamental background.

Basic disciplines: chemistry, biology, bioinformatics, biochemistry, mathematics, computer science and basic programming, metabolomics, organic synthesis, biomaterials science, applied medical biotechnology, large workshop on medical biotechnology.

The objects of professional activity of graduates are: microorganisms, cellular structures of animals and plants, viruses, enzymes, biologically active chemicals; devices and equipment for studying the properties of used microorganisms, cellular structures and substances obtained with their help in laboratory and industrial conditions; plants and equipment for biotechnological processes; means of quality control of raw materials, semi-finished products and finished products. The field of activity of graduates extends from the creation of artificial organs using technical means or the search for ways to grow organs and tissues using regenerative medicine methods to compensate for reduced or lost physiological functions (biomedical engineering) and to the development of genetically modified organisms, for example, agricultural plants and animals (genetic engineering), as well as molecular design of compounds with desired properties (chemoinformatics, protein engineering, engineering enzymology).

Places for internships for students and subsequent employment of graduates:

Pharmaceutical companies, biotechnology companies, Research Medical Centers, scientific laboratories. Graduates of the undergraduate program can continue their studies at the master's program at TSU or other universities. From the 4th year there is a selection for the double degree program (TSU-France, ParisTech University) «Translational chemical and biomedical technologies» of the master's level.



tisp_tsu



tisp.tsu



tsuTISP

tisp.tsu.ru/apply/



АВТОНОМНАЯ МАГИСТЕРСКАЯ ПРОГРАММА «ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ И БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ»



Химический факультет



САЕ Институт «Умные материалы и технологии»

Направление подготовки	Химия
Факультет	Химический факультет
Форма обучения	Смешанный формат обучения
Продолжительность программы	2 года
Язык обучения	Русский
Бюджетные места	20

Условия приёма

Приём на первый курс магистратуры проводится на конкурсной основе по заявлениям лиц, имеющих высшее образование. Победители и призеры олимпиад («Магистр ТГУ», «Химия биотехнологий», «Я - профессионал») имеют возможность получить максимальный балл за вступительный экзамен.

Вступительные испытания: экзамен по химии, собеседование.

Магистерская программа включает возможность обучения по программе двойного диплома совместно с университетом Chimie ParisTech (Франция). За период обучения по одной программе магистратуры можно получить дипломы двух Университетов, углублено освоить курсы химической технологии и инженерии материалов.

КЛЮЧЕВЫЕ ДИСЦИПЛИНЫ ПРОГРАММЫ

Основы общей иммунологии	Введение в медицинскую биологическую химию	Молекулярные методы в биомедицинских исследованиях
Основы клеточной биологии и диагностики клеточных систем	Химические технологии в медицине	Основы биоинформатики
Физико-химические методы анализа органических соединений и фармацевтических субстанций	Биоматериаловедение	Прикладная биоинформатика
		Молекулярная онкология

Магистратура «Трансляционные химические и биомедицинские технологии» – ЭТО:

- междисциплинарные знания на стыке химии, биологии, фармакологии, клеточной и молекулярной биомедицины
- компетенции по проведению доклинических и клинических испытаний, разработка технологического регламента, сертификации, маркетингу и малотоннажному производству продукта
- стажировки в ведущих мировых университетах
- диплом международного уровня
- работа с новыми технологиями
- освоение полного цикла получения продукта: синтез-исследование, доклинические исследования, сертификация, маркетинг

КОНТАКТЫ

Менеджер программы: **Шаповалова Елена**, +7 (953) 928 15 49, egshapovalova@yandex.ru
Заявки оставляйте на сайте: chembiomed.ru или через telegram-бота @smii_tsu_bot

chembiomed.ru [chembiomed](https://vk.com/chembiomed)



ПРЕИМУЩЕСТВА ПРОГРАММЫ

- Обучение на базе научных центров ТГУ и Томского НИЦМ, университетов Гейдельберга и Мюнстера (Германия)
- Ведущие зарубежные и российские специалисты
- Индивидуальная образовательная траектория
- Более 30% учебных дисциплин составляют курсы по выбору
- Виртуальные лаборатории Labster (Технический университет Дании)
- Востребованность специалистов по трансляционным химическим и биомедицинским технологиям

ВЕДУЩИЕ ПРЕПОДАВАТЕЛИ



Курина Ирина Александровна
Руководитель магистерской программы, д.ф.м.-н., доцент, заведующая базовой кафедрой природных соединений, фармацевтической и медицинской химии ХФ ТГУ, зам. заведующего лабораторией трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, Томск, Россия.



Ключковская Юлия Георгиевна
Соруководитель магистерской программы, д.б.н., профессор, зав. лабораторией трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, Томск, Россия. Университет Гейдельберга, Медицинский факультет, Заведующая Отделом Врожденного Иммуитета и Иммунологической Толерантности Института Трансфузионной Медицины и Иммунологии, Мангейм, Германия.



Рыбов Вячеслав Валерьевич
д.м.н., заместитель директора по научной и лечебной работе НИИ кардиологии Томского НИМЦ, и. о. руководителя отделения неотложной кардиологии, профессор кафедры кардиологии ФПК и ППС СибГМУ, в. н. с. лаборатории трансляционной и клеточной биомедицины НИ ТГУ.



Чурина Елена Георгиевна
д.м.н., профессор кафедры органической химии ХФ ТГУ, врач иммунолог-аллерголог, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ, член российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов, Томск, Россия.



Хайнрих Лотар Альфред
д.х.н., в.н.с. лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины НИ ТГУ, Томск, Россия. President of marcotech oHG, Honorary professor of the Westphalian Wilhelms University, Muenster. Руководитель блока инновационных материалов для регенеративной медицины, Мюнстер, Германия.



Инженер-технолог

Инженер-разработчик

Инженер-исследователь



СОРБЕНТЫ • ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА • НАНОСТРУКТУРНЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ
ХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ • НОВЫЕ ТИПЫ МАТЕРИАЛОВ
ЭЛЕКТРОННЫЙ УЧЕБНЫЙ КУРС • ВИРТУАЛЬНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Дополнительная профессиональная образовательная программа профессиональной переподготовки по теме

«МЕТОДЫ РАЗРАБОТКИ И ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ПЕРСПЕКТИВНЫХ НАНОСТРУКТУРНЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ И СОРБЕНТОВ ДЛЯ НЕФТЕХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА»

- Основана на компетентностном подходе
- Использует вариативно-модульный принцип построения образовательного процесса
- Выбор модуля обеспечивает формирование требуемых профессиональных компетенций
- Содержание программы разработано в соответствии с потребностями предприятий-производителей катализаторов и сорбентов.

Руководитель программы:

Курзина Ирина Александровна

Kurzina99@mail.ru

Томский государственный университет

САЕ Институт «Умные материалы и технологии»

г. Томск, пр. Ленина, 36



САЕ Институт «Умные материалы и технологии»



ФОНД ИНФРАСТРУКТУРНЫХ И ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ
Группа РОСНАНО

г. Томск

СОДЕРЖАНИЕ

ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ И РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ, КОМПОНЕНТОВ АКТ/mTOR В ТКАНИ РАКА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ Д.И. Азовский, А.И. Павлова	9
ОЦЕНКА РЕГУЛЯТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА rs56119169(C/A) И rs16910241(C/A), АССОЦИИРОВАННЫХ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА Т.И. Алиев, А.О. Дегтярёва	12
АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО 1,4-БЕНЗОДИАЗЕПИН-2-ОНА А.Е. Алифоренко, В.В. Быков, В.С. Мотов	15
РОЛЬ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ Ю.Г. Бирулина, Е.Е. Буйко, Н.А. Чернышов	18
СРАВНЕНИЕ <i>IN VITRO</i> КОНЬЮГАТОВ АФФИБОДИ ДЛЯ HER-2 ТЕРАПИИ, СОДЕРЖАЩИХ АЛЬБУМИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН И ПОЛИПЕПТИД RAS В.В. Боденко	21
ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДОМИМЕТИКА КАМП-1 Е.А. Бондарева, М.С. Солдатова, Е.М. Любушкина	24
ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОСПАЕЧНЫХ СВОЙСТВ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ИМПЛАНТАТОВ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ ИЗ ФТОРПОЛИМЕРА МЕТОДОМ 3D ПЕЧАТИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ЭНДОПРОТЕЗА ДЛЯ ГЕРНИОПЛАСТИКИ А.О. Воробьев, А.Е. Лейман	27
ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМА ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ЛИНИИ BT549 С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА MYC К.А. Гаптулбарова, Е.А. Кравцова, И.А. Цыденова	30
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ПРОДУЦЕНТОМ <i>MEDUSOMYCES GISEVII</i> SA-12 НА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТАХ МИСКАНТУСА СОРТА КАМИС Е.К. Гладышева, Е.И. Кашеева, Ю.А. Гисматулина	33
ФАРМАКОКИНЕТИКА НОВОГО АНАЛЬГЕТИКА НА ОСНОВЕ 2Н-ХРОМЕНА Н.В. Гуркин, В.В. Быков, И.В. Ильина	36
ВЛИЯНИЕ КОЛИЧЕСТВА АМПЛИФИКАЦИЙ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ НА УРОВЕНЬ ИХ ЭКСПРЕССИИ И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И ОПУХОЛЕЙ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Д.С. Долгашева, И.А. Цыденова, Е.А. Кравцова	39
ВЛИЯНИЕ КСЕНОГЕННЫХ ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА <i>IN VIVO</i> А.Б. Доржиева	42
СОЗДАНИЕ КСЕНОГРАФТА ИЗ КЛЕТОК ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ З.Б. Жалгасбаева	45
ИССЛЕДОВАНИЕ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНЫХ СОСТОЯНИЙ А.В. Журкина, П.Е. Никифоров	48
СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ЯИЧНИКОВ А.Д. Казакова, А.Ю. Калинин, И.В. Ларионова	51
ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ БИОКОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА Н.К. Канашева, А.А. Губанков, Д.А. Федоришин	54
РАЗЛИЧИЯ В ДИНАМИКЕ СИСТЕМНОЙ ПАТОЛОГИИ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ТРЕМЯ ВИДАМИ ОПИСТОРХИД (<i>O. FELINEUS</i> , <i>O. VIVERRINI</i> И <i>C. SINENSIS</i>) НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ <i>M. AURATUS</i> Я.К. Капушак, О.Г. Запарина	57

АНТИНОЦИЦЕПТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ КЛАССА ГЕКСААЗАИЗОВЮРЦИТАНОВ Е.А. Киселева, О.В. Байбакова	60
АССОЦИАЦИЯ ИНТЕРНЕТ-ЗАВИСИМОСТИ И ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ (RS4680 COMT И RS1044396 CHRNA4) У ПОДРОСТКОВ К.В. Копылова	63
ИЗМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛАНДШАФТА ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АНТРАЦИКЛИН-СОДЕРЖАЩИХ СХЕМ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ Е.А. Кравцова, К.А. Гаптулбарова, Д.С. Долгашева	66
ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ АМРК НА ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ХРОНИЧЕСКОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИППОКСИИ ПРИ ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННОМ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ Б.К. Курбатов, И.А. Дергачев	69
АССОЦИАЦИИ ХАРАКТЕРИСТИК УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА С БЕЛКАМИ ЛЕГОЧНОГО СУРФАКТАНТА SP-A И SP-D В ПОПУЛЯЦИИ ГОРОДА НОВОСИБИРСК Я.К. Лапицкая, И.А. Косарев, Ш.Т. Насирова	72
ИНФЕКЦИИ ТРЕМАТОДАМИ OPISTHORCHIS VIVERRINI, OPISTHORCHIS FELINEUS И CLONORCHIS SINENSIS ВЫЗЫВАЮТ ВИДОСПЕЦИФИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПЕЧЕНИ ХОМЯЧКОВ MESOCRICETUS AURATUS Е.А. Лишай	75
ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНТОКСИЧНОСТИ ЭКСТРАКТА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК КОПЕЕЧНИКА АЛЬПИЙСКОГО (HEDYSARUM ALPINUM L.) В.А. Лобанова, М.В. Филонова	78
МЕТАБОЛОМ МОЧИ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС ЛИНИИ НИСАГ А.А. Малявко, Ю.К. Политыко, А.А. Серяпина	81
IN VITRO EVALUATION OF THE BIOLOGICAL EFFECTS OF JUNIPERUS PSEUDOSABINA, TAXUS CUSPIDATA AND LARIX GMELINII G.M. Medetova, A.E. Mudrikova, E.G. Shapovalova	84
НОВАЯ ГЕРМИНАЛЬНАЯ МУТАЦИЯ ГЕНА BRCA2 У МОЛОДОЙ ПАЦИЕНТКИ ТУВИНСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ДИАГНОЗОМ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ А.Ю. Молоков, Г.А. Кононова	87
ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ CD-МАРКЕРОВ КЛЕТКАМИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ (CD3, CD36, CD68) ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ И.А. Осихов	90
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ OPISTHORCHIS FELINEUS НА КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ ЧЕЛОВЕКА: ХОЛАНГИОЦИТЫ H69 И ПЕРВИЧНЫЕ ЭНДОТЕЛИОЦИТЫ Д.В. Пономарев	93
ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО ПЕПТИДА, МЕЧЕНОГО РАДИОНУКЛИДОМ ЛЮТЕЦИЕМ-177, В КУЛЬТУРЕ ПСМА-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РАКОВЫХ КЛЕТОК А.А. Прач, Ф.Ш. Юладшева, Г.Е. Янович	96
АНАЛИЗ ГЕННОГО ПРОФИЛЯ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ РАКА IN VITRO М.А. Ракина, Т.С. Сударских, И.В. Ларионова	99
ОСОБЕННОСТИ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА У ЖЕНЩИН С РАССТРОЙСТВАМИ ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ Е.И. Ромашко	102
АНАЛИЗ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАЗЛИЧНЫМИ КЛЕЩЕВЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ К.В. Самойлов, А.В. Семенова, О.В. Ямпольская	105
СТИМУЛЯЦИЯ КАННАБИНОИДНЫХ СВ2 РЕЦЕПТРОВ ПРЕДУПРЕЖДАЕТ РЕПЕРФУЗИОННОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ СЕРДЦА М.А. Сиротина	108

ФАКТОРЫ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ, МОДУЛИРУЮЩИЕ ЭКСПРЕССИЮ PFKFB3 В МАКРОФАГАХ Т.С. Сударских, М.А. Ракина, И.В. Ларионова	111
АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОЦЕССОВ АНГИОГЕНЕЗА, ВОСПАЛЕНИЯ И ОРГАНИЗАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПРИ ОБРАБОТКЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ РАН МЫШЕЙ БЕЛКАМИ ТРЕМАТОД <i>ORISTHORCHIS FELINEUS</i> А.А. Тарасенко	114
ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ И ОБРАБОТКИ ПОВЕРХНОСТИ БИОМАТЕРИАЛА ИЗ НИКЕЛИДА ТИТАНА (ТН-10) НА ЦИТОСОВМЕСТИМОСТЬ С КЛЕТКАМИ ЛИНИИ 3Т3 (ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ ФИБРОБЛАСТЫ) А.М. Темирова	117
ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ ДИАТОМИТА КУКУРБИТ[6]УРИЛОМ НА ГЕМОЛИТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ Д.А. Федоришин, Г.К. Жумабаева, А.Э. Ухов	120
ВЛИЯНИЕ НА ТЕЧЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННОЙ <i>IN VIVO</i> БУЛЛЕЗНОЙ КЕРАТОПАТИИ ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ Е.О. Филиппова	123
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, АНАЛОГИ МЕТОЗОЛОМИДА, КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ДЛЯ ХИМИОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ А.Х. Хумаири	126
МЕХАНИЗМЫ ВЫХОДА ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ИЗ ПОСТХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ШОКА И.А. Цыденова, Д.С. Долгашева, К.А. Гаптулбарова	129
ВЗАИМОСВЯЗЬ ФАКТОРОВ ОЖИРЕНИЯ И БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ Н.А. Чернышов, Е.А. Моглохова, Ю.Г. Бирулина	132
БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ГЕНОМНОГО КОНТЕКСТА НА НАРУШЕНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ БЕРЕМЕННОСТИ Д.Г. Шевцов, О.Ю. Васильева, С.А. Филатова	135
THE INFLUENCE OF CHRONIC INTRAUTERINE ALCOHOL INTOXICATION ON THE MORPHOMETRIC PARAMETERS OF THE MAIN COMPONENTS OF THE CEREBRAL CORTEX OF HUMAN EMBRYOS S.N. Shumilova	138
РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ И СРЕДСТВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИК ТОМОГРАФИИ ГЕМАТОМ Е.А. Юрченко	141
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ ИММУННОГО ИНФИЛЬТРАТА В ОПУХОЛИ ЯИЧНИКА П.С. Ямщиков, Е.О. Казакова, И.В. Ларионова	144

УДК 616-006.04

**ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ И РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ, КОМПОНЕНТОВ
АКТ/mTOR В ТКАНИ РАКА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ**

Д.И. Азовский, А.И. Павлова

Научный руководитель: д.м.н., Л.В. Спирина

НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

E-mail: azovdaniil@yandex.ru

**EXPRESSION OF TRANSCRIPTION AND GROWTH FACTORS, AKT/MTOR COMPONENTS
IN COLON CANCER TISSUE**

D.I. Azovsky, A.I. Pavlova

Scientific Supervisor: Dr., L.V. Spirina

Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kooperativniy lane, 5, 634009

E-mail: azovdaniil@yandex.ru

Abstract. *Colorectal cancer (CRC) is one of the possible causes of death from oncological diseases in the world, and is also one of the most common forms of oncological diseases, which is characterized by a continuing steady increase in incidence, likely frequent recurrence, and early metastasis. Among the identified signaling cascades that determine the characteristics of a biological disease, great importance is attached to the AKT/mTOR signaling pathway. The aim of the study was to study the expression of the components of the AKT/mTOR signaling pathway in tumors in patients with colorectal cancer, in connection with the clinical and morphological parameters of the disease and the objective response of the tumor to antitumor treatment.*

Введение. Колоректальный рак (КРР) одна из ведущих причин смерти от онкологических заболеваний в мире, а также является одной из самых распространенных форм онкологической патологии, которая характеризуется продолжающимся неуклонным ростом заболеваемости, значительной частотой развития рецидивов, ранним метастазированием [1, 2]. Среди множества сигнальных каскадов, определяющих особенности биологического поведения опухоли, большое значение придается АКТ/mTOR сигнальному пути.

Цель исследования заключалась в изучении экспрессии компонентов АКТ/mTOR сигнального пути в опухоли у больных колоректальным раком, в связи с клинико-морфологическими параметрами заболевания и объективным ответом опухоли на противоопухолевое лечение.

Экспериментальная часть. В исследование было включено 26 больных колоректальным раком в возрасте от 43 до 75 лет (средний возраст составил 54 года). В клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ больные получали комбинированное лечение, которое включало неoadъювантную химиотерапию по схеме FOLFOX, либо XELOX, с последующей радикальной операцией.

Экспрессия компонентов АКТ/mTOR сигнального пути в ткани опухоли определялась методом ПЦР в реальном времени. Статистическая обработка была проведена с помощью пакета статистических программ STATISTICA 12.0.

Результаты. Выявлено изменение экспрессии АКТ, GSK-3 β , 70S бкиназы mTOR в группах с увеличением размера опухоли [3]. Поражение регионарных лимфоузлов и увеличение их количества было связано с уровнем мРНК 70S бкиназы, PTEN, GSK-3 β и mTOR. При наличии отдаленных метастазов наблюдалось снижение экспрессии c-RAF в 356 раз по сравнению с пациентами со стадией T2-3N0-1M0.

Клинико-морфологические параметры играют большое значение в оценке клинического прогноза пациента за счет влияния на компоненты АКТ/mTOR сигнального каскада. Gao B, и соавторы (2020) выявили участие АКТ/GSK-3 β сигнального каскада в регуляции пролиферации клеток и их апоптоза [4]. Сходные факты были показаны и в проведенном исследовании, где рост опухоли был связан с увеличением экспрессии АКТ, GSK-3 β , 70S бкиназы, mTOR.

Отмечена связь уровня гистологической организации опухоли с экспрессией изучаемых маркеров. Снижение степени дифференцировки происходило на фоне уменьшения экспрессии c-RAF и увеличение уровня мРНК 70S бкиназы в 17,4 и 7,46 раза в низкодифференцированных опухолях, соответственно, по сравнению с высокодифференцированными [5].

В настоящее время результаты клинических исследований пациентов с КРР свидетельствуют о зависимости локализации первичной опухоли и прогностическом эффекте исхода заболевания [6]. Прогностическая ценность воспалительных биомаркеров значительно различались между правосторонней и левосторонней локализацией опухолевого процесса [7, 8]. Так, при левосторонней локализации опухолевого процесса экспрессия PDK выше по сравнению с пациентов с правосторонними опухолями. Экспрессия PDK при левосторонней локализации опухолевого процесса выше в 4,24 раза в сравнении с показателями пациентов с правосторонними опухолями [9, 10]. Выявлено увеличение количества пациентов с размером опухоли T4N1-2M0 и T3-4N2M0 на 30,5% и 17,0 соответственно.

Кроме того, выявлено увеличение экспрессии 4EBP1 в 1,25 раза в ткани опухоли после проведенной химиотерапии по схеме FOLFOX. Отмечено снижение экспрессии c-RAF и увеличение уровня мРНК PDK1 по мере снижения эффекта терапии. Фосфорилирование эукариотического фактора инициации трансляции 4E (eIF4E) – связывающего белка (4EBP1) приводит к высвобождению eIF4E, снимая репрессию трансляции, тем самым усиливая синтез канцерогенного белка [11]. Chen Y и соавторы (2017) по результатам исследования пришли к выводу, что высокий уровень 4EBP1 связан с прогрессированием опухоли и неблагоприятным прогнозом [12, 13]. 4EBP1 может быть новым биомаркером для прогнозирования клинического исхода пациентов с колоректальным раком. Выявлено, что содержание мРНК 4EBP1 увеличивается в 2,6 раз после терапии.

Заключение. В результате проведенного исследования получены новые сведения о механизмах метастазирования опухоли. Выявлены особенности экспрессии компонентов АКТ/mTOR сигнального пути связанные с размером опухоли, поражением регионарных лимфоузлов и степенью дифференцировки опухоли. Впервые отмечен факт связи экспрессии молекулярных маркеров с локализацией опухолевого процесса. Высокая экспрессия PDK1 является маркером левосторонних опухолей. Обоснованы молекулярные механизмы, связанные с эффектом терапии у больных колоректальным раком.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brenner H., Kloor M., Pox C.P. Colorectal cancer // *Lancet*. – 2014. – Vol. 383, № 9927. – P. 1490-1502.
2. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics // *CA: Cancer. J. Clin.* – 2018. – № 68. – P. 7-30.
3. Pernot S. Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives // *Trends Cell Biol.* – 2012. – Vol. 21. – P. 21-24.
4. Gao B., Zhao L., Wang F., Bai H., Li J., Li M., Hu X., Cao J., Wang G. Knockdown of ISOC1 inhibits the proliferation and migration and induces the apoptosis of colon cancer cells through the AKT/GSK-3 β pathway // *Carcinogenesis*. – 2020. – Vol. 41., № 8. – P. 1123-1133.
5. Pópulo H., Lopes J.M., Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer // *Int J Mol Sci.* – 2012. – Vol. 13, № 2. – P. 1886-1918.
6. Федянин М.Ю., Трякин А.А., Тюляндин С.А. Локализация первичной опухоли толстой кишки: есть ли принципиальные отличия? // *Тазовая хирургия и онкология*. – 2017. – Т. 7, № 3. – С. 1-14.
7. Stintzing S., Tejpar S., Gibbs P., Thiebach L., Lenz H.J. Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes // *Eur J Cancer*. – 2017. – Vol. 84. – P. 69-80.
8. Shussman N., Wexner S.D. Colorectal polyps and polyposis syndromes // *Gastroenterol. Rep.* – 2014. – Vol. 2. – P. 1–15.
9. Tokunaga R., Xiu J., Johnston C., Goldberg R.M., Philip P.A., Seeber A., et al. Molecular Profiling of Appendiceal Adenocarcinoma and Comparison with Rightsided and Left-sided Colorectal Cancer // *Clin Cancer Res.* – 2019. – Vol. 25, № 10. – P. 3096-3103.
10. Valle L., Vilar E., Tavtigian S.V., Stoffel E.M. Genetic predisposition to colorectal cancer: Syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine // *J. Pathol.* – 2019. – Vol. 247. – P. 574-588.
11. White E.J., Martin V., Liu J.L. et al. Autophagy regulation in cancer development and therapy // *Am. J. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 11. – P. 362-372.
12. Chen Y.H., Pan S.L., Wang J.C., Kuo S.H., Cheng J.C., Teng C.M. Radiation-induced VEGF-C expression and endothelial cell proliferation in lung cancer // *Strahlenther Onkol.* – 2014. – Vol. 190, № 8. – P. 1154-62.
13. Chen Y., Wang J., Fan H., Xie J., Xu L., Zhou B. Phosphorylated 4E-BP1 is associated with tumor progression and adverse prognosis in colorectal cancer // *Neoplasma*. – 2017. – Vol. 64, № 5. – P. 787-794.

УДК 575

**ОЦЕНКА РЕГУЛЯТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА rs56119169(C/A) И rs16910241(C/A),
АССОЦИИРОВАННЫХ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА**Т.И. Алиев¹, А.О. Дегтярёва²

Научный руководитель: к.б.н. Е.В. Антонцева

¹Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,

Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090

²Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 10, 630090

E-mail: aliev.timur99@yandex.ru

**ASSESSMENT OF THE REGULATORY POTENTIAL OF rs56119169(C/A) AND rs16910241(C/A)
ASSOCIATED WITH PARKINSON'S DISEASE**T.I. Aliev¹, A.O. Degtyareva²

Scientific Supervisor: PhD., E.V. Antontseva

¹Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogov str., 2, 630090²Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Academician Lavrentiev str., 10, 630090

E-mail: aliev.timur99@yandex.ru

Abstract. *In the present study, we performed the in vitro and in vivo evaluation of two single-nucleotide polymorphisms (rs56119169, rs16910241) associated with Parkinson's disease. The purpose of the research work was to study regulatory potential of rs56119169, rs16910241. First of all, we have found potential regulatory SNPs applying the original bioinformatics method designed in our laboratory. Then we evaluated how SNPs affect the binding of any transcription factors (TF) to DNA by the Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The research results showed that an allele A of rs56119169 damages TF binding sites; by contrast, an allele A of rs16910241 creates new TF binding sites. We have predicted these TF by MotifbreakR and verified them. We suppose rs56119169 damages MAZ, SP1, KLF13 binding sites, rs16910241 damages RAR site. Using reporter assay we have examined the relations between alleles of each SNP and reporter gene expression level. We have created reporter constructs for each polymorphism and transfected them into HepG2 cell line. The research results showed that the allele A of rs56119169 leads to a decrease expression level, rs16910241 does not change the expression level.*

Введение. Одной из важных задач медицинской генетики является изучение молекулярных механизмов развития нейродегенеративных заболеваний человека, в частности болезни Паркинсона. Самым частым типом мутаций в геноме являются однонуклеотидные замены – SNPs, способные не только изменять кодируемую аминокислоту, но и влиять на уровень экспрессии генов, располагаясь в регуляторных районах. Такие SNP называют регуляторными. В лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦиГ СО РАН был разработан биоинформатический алгоритм для поиска потенциально регуляторных SNPs, основанный на выявлении аллель-специфичных регуляторных событий в комплексе экспериментальных данных (ChIP-seq и RNA-seq для одного и того же образца) и находящихся в

открытом доступе (архив SRA NCBI), или полученных самостоятельно [1]. Применяв данный подход, удалось выявить панель из более чем 20000 потенциально регуляторных полиморфизмов. Для работы были отобраны два SNP, потенциально ассоциированных с болезнью Паркинсона: rs56119169, расположенный в промоторной области гена *MYL6* и rs16910241, расположенный на расстоянии 750 п.н. от стоп-кодона гена *H4-16*. Цель: провести функциональный анализ регуляторного потенциала однонуклеотидных полиморфизмов rs56119169 (C>A) и rs16910241 (C>A), ассоциированных с развитием болезни Паркинсона.

Экспериментальная часть. Олигонуклеотиды и праймеры, использованные в работе, были синтезированы в ООО «Биосет» (Новосибирск). В работе использовали самцов мышей линии CC57BR/Mv разведения вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Клеточная линия HepG2 (линия гепатоцеллюлярной карциномы человека) была предоставлена Центром клеточных технологий ИЦиГ. Методом задержки ДНК-пробы в геле белками ядерного экстракта (EMSA) была проведена оценка способности исследуемых rSNPs разрушать или создавать сайты связывания неких транскрипционных факторов (ТФ). С помощью программы пакета *MotifbreakR* предсказаны мотивы сайтов связывания ТФ, которые могут нарушаться однонуклеотидными заменами rs56119169, rs16910241. Часть из них была верифицирована с помощью конкурентного анализа. Для оценки rs56119169, rs16910241 на уровень экспрессии репортёрного гена в условиях *in vivo* созданы репортёрные конструкции на базе векторов pGL3-*Basic* и pGL4.23 соответственно. Трансфекция проведена на клеточных линиях HepG2.

Результаты.

rs56119169. Выявлено, что аллель А в положении rs56119169 приводит к разрушению сайтов связывания неких ТФ. Удалось предсказать и верифицировать некоторые ТФ: MAZ, SP1, KLF13. Проведённая трансфекция репортёрных конструкций на базе вектора pGL3 Basic в эукариотические клетки показала, что уровень экспрессии репортёрного гена люциферазы существенно и достоверно ($p < 0,05$) снижался именно в случае аллеля А.

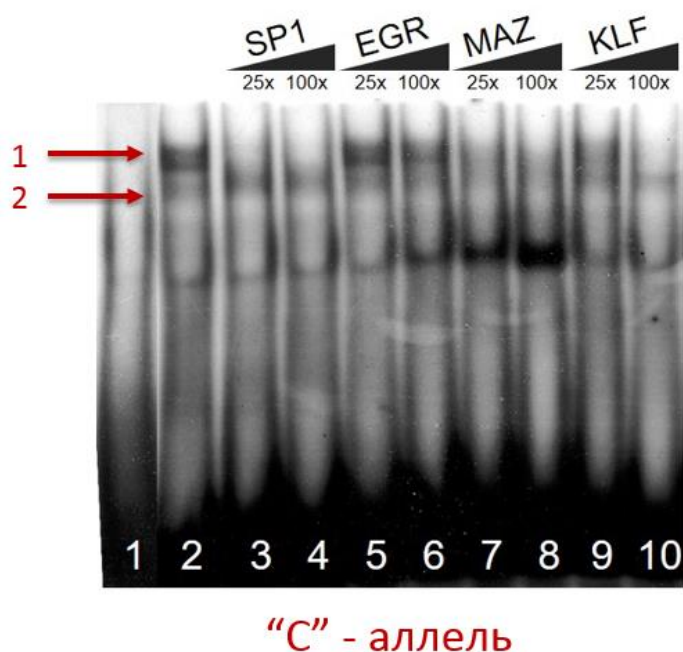


Рис. 1. Конкурентный анализ для rs56119169 с олигонуклеотидами, содержащими сайты связывания SP1, EGR, MAZ, KLF13

rs16910241. Выявлено, что аллель А в положении rs16910241 приводит к появлению сайтов связывания неких ТФ. Удалось предсказать и верифицировать ТФ, сайт связывания которого может возникать при данной замене – RAR (изомер DR-5). Проведённая трансфекция репортёрных конструкций на базе вектора pGL4.23 в эукариотические клетки не показала значимого изменения уровня экспрессии репортёрного гена люциферазы.

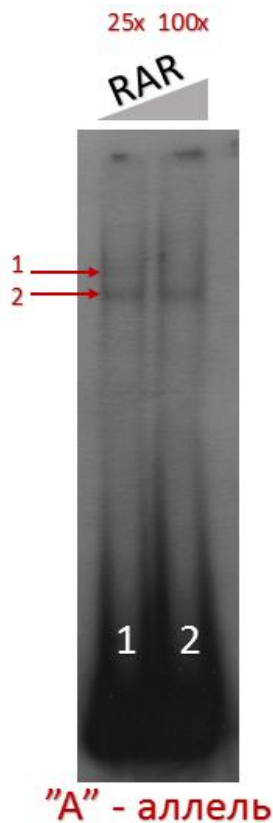


Рис. 2. Конкурентный анализ для rs16910241 с олигонуклеотидом, содержащим сайт связывания RAR

Заключение. В результате проведенных исследований показано, что исследуемые SNP rs56119169 (C>A) и rs16910241 (C>A) обладают регуляторной способностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Korbolina, E.E., Bryzgalov, L.O., Ustrokhanova, D.Z., Postovalov, S.N., Poverin, D.V., Damarov, I.S., Merkulova, T.I. A panel of rSNPs demonstrating allelic asymmetry in both ChiP-seq and RNA-seq data and the search for their phenotypic outcomes through analysis of DEGs // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – Is.14. – P. 7240.

УДК 615.2

АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО 1,4-БЕНЗОДИАЗЕПИН-2-ОНА

А.Е. Алифоренко, В.В. Быков, В.С. Мотов

Научный руководитель: профессор, д.м.н., А.И. Венгеровский

Сибирский государственный медицинский университет,

Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050

E-mail: gundareva_ae@mail.ru

ANALGESIC ACTIVITY OF THE 1,4-BENZODIAZEPIN-2-ONE DERIVATIVE

A.E. Aliforenko, V.V. Bykov, V.S. Motov

Scientific Supervisor: Prof., Dr., A.I. Vengerovskii

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow Trakt str., 2, 634050

E-mail: gundareva_ae@mail.ru

Abstract. *The analgesic activity of the 1,4-benzodiazepin-2-one derivative (PAV-0056) was studied in experimental pain models in mice. PAV-0056 compound in a wide range of low doses (0.01–1 mg/kg) causes pronounced analgesia in models of thermal, chemogenic, somatic and visceral pain; its analgesic activity is not inferior to the effects of diclofenac sodium at a dose of 10 mg/kg and tramadol at a dose of 20 mg/kg.*

Введение. Одной из современных стратегий поиска новых анальгетиков является создание антагонистов аутокоидов (брадикинина, гистамина, серотонина), препятствующих их активирующему влиянию на ноцицептивную систему [1–2]. Эндогенный нонапептид брадикинин принимает участие во многих патологических процессах, связанных с воспалением и гипералгезией. Эффекты брадикинина опосредуются его связыванием с В-рецепторами [3]. Антагонистами В-рецепторов являются производные 1,4-бензодиазепин-2-она [4], среди них наиболее высокой анальгетической активностью обладает соединение, обозначенное шифром PAV-0056 [5]. Целью исследования являлось изучение анальгетической активности соединения PAV-0056 на экспериментальных моделях боли.

Экспериментальная часть. Эксперименты выполняли на 192 свободных от патогенной флоры мышцах самцах стока CD-1 (масса тела 20–25 г, возраст 8–13 недель). Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом СибГМУ (заключение № 8992 от 21.02.2022). Для оценки анальгетического действия в желудок мышам вводили соединение PAV-0056 в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг или препараты сравнения диклофенак натрия (Хемофарм, Сербия) в дозе 10 мг/кг и трамадол (Pharmaceuticals Formenti S.p.A., Италия) в дозе 20 мг/кг. Все вещества растворяли в 0,5 мл 1 % водного раствора поливинилпирролидона (Plasdone S-630, Ashland Inc., США). Контрольные животные получали растворитель в эквивалентном объеме.

Тест «горячая пластина». Мышей помещали на нагретую до 55 ± 1 °С металлическую поверхность (термостоллик НWT-75, Россия). Измеряли время до наступления первой болевой реакции, зарегистрированной по отдергиванию и облизыванию лапок [1].

Тест отдергивания хвоста при погружении в горячую воду. Хвост мышей на половину длины погружали в воду с температурой 45 ± 1 °С (водяная баня Sakura 1450, Япония). Измеряли время до отдергивания хвоста [1].

Формалиновый тест. Мышам под плантарный апоневроз задней конечности вводили 0,02 мл 0,5 % водного раствора формалина (Sigma-Aldrich, США). В течение первых 15 мин (острая фаза боли) и последующих 45 мин (тоническая фаза боли) регистрировали болевые реакции по количеству облизываний и потряхиваний поврежденной лапки [1].

Тест «уксусные корчи». Мышам вводили внутривентриально 0,75 % водный раствор уксусной кислоты (Sigma-Aldrich, США) в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела. В течение 20 мин оценивали количество сокращений брюшных мышц («корчей») и время до наступления первой корчи [1].

Результаты обрабатывали статистически с помощью программы Statistica v. 8.0 (StatSoft, США). Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Различия между выборками устанавливали при помощи t-критерия Стьюдента, считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В тесте «горячая пластина» анальгетическая активность соединения PAV-0056 в дозах 0,1 и 1 мг/кг была сопоставима с эффектом диклофенака натрия в дозе 10 мг/кг ($p > 0,05$), но уступала действию трамадола в дозе 20 мг/кг ($p < 0,05$) (рис. 1).

В тесте отдергивания хвоста соединение PAV-0056 в дозе 1 мг/кг на 46 % удлиняло у мышей время до отдергивания хвоста, погруженного в горячую воду ($p < 0,05$), в дозах 0,1 и 0,01 мг/кг не вызывало анальгезию (рис. 2).

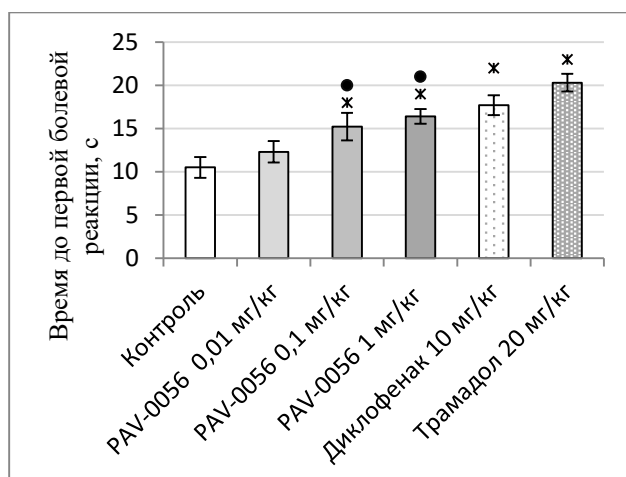


Рис. 1. Время до первой болевой реакции в тесте «горячая пластина» при введении мышам ($n = 6$) соединения PAV-0056, диклофенака натрия и трамадола: * различия с показателем контрольной группы, $p < 0,05$, • различия с показателем группы, получавшей трамадол, $p < 0,05$

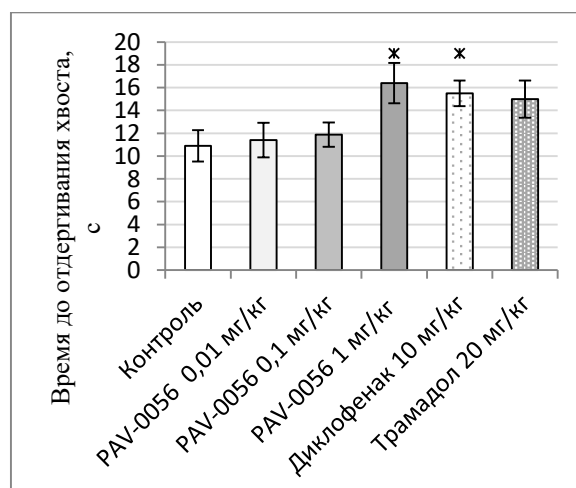


Рис. 2. Латентный период до появления болевой реакции у мышей ($n = 10$) в тесте отдергивания хвоста после погружения в горячую воду при введении соединения PAV-0056, диклофенака натрия и трамадола: * различия с показателем контрольной группы, $p < 0,05$

При субплантарной инъекции формалина соединение PAV-0056 в дозах 0,01–1 мг/кг вызывало анальгезию в такой же степени как диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг и трамадол в дозе 20 мг/кг в фазах острой и тонической боли ($p < 0,05$) (таблица 1).

Таблица 1

Альгетическая активность соединения PAV-0056, диклофенака натрия и трамадола при введении мышам ($n = 10$) в формалиновом тесте, $M \pm t$

Количество реакций	Группа					
	Контроль	PAV-0056 0,01 мг/кг	PAV-0056 0,1 мг/кг	PAV-0056 1 мг/кг	Диклофенак 10 мг/кг	Трамадол 20 мг/кг
Фаза I	31 ± 3	19 ± 1*	14 ± 1*	16 ± 1*	20 ± 4*	21 ± 3*
Фаза II	15 ± 2	6 ± 1*	6 ± 2*	8 ± 3*	7 ± 2*	9 ± 2*

* $p < 0,05$ по сравнению с показателем контрольной группы.

В тесте «уксусные корчи» альгетическое действие соединения PAV-0056 в дозах 0,1 и 1 мг/кг не уступало эффекту диклофенака натрия в дозе 10 мг/кг, в дозе 0,1 мг/кг было слабее действия трамадола в дозе 20 мг/кг (таблица 2).

Таблица 2

Альгетическая активность соединения PAV-0056, диклофенака натрия и трамадола при введении мышам ($n = 6$) в тесте «уксусные корчи», $M \pm t$

Показатель	Группа					
	Контроль	PAV-0056 0,01 мг/кг	PAV-0056 0,1 мг/кг	PAV-0056 1 мг/кг	Диклофенак 10 мг/кг	Трамадол 20 мг/кг
Время до наступления первой корчи, с	258 ± 8	336 ± 66	312 ± 10**	326 ± 59	385 ± 39*	393 ± 47*
Количество корчей, шт.	37 ± 1	29 ± 4	20 ± 2*	16 ± 2*	19 ± 4*	12 ± 3*

* $p < 0,05$ по сравнению с показателем контрольной группы, # $p < 0,05$ по сравнению с показателем группы, получавшей трамадол.

Заключение. Соединение PAV-0056 в широком диапазоне доз (0,01–1 мг/кг) вызывает выраженную альгезию на моделях термической, хемогенной, соматической и висцеральной боли, по альгетической активности не уступает эффекту диклофенака натрия в дозе 10 мг/кг и трамадола в дозе 20 мг/кг, оценивается как безопасное лекарственное средство с высокой альгетической активностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2013. – 944 с.
2. Gonçalves E.C.D., et al. Bradykinin receptors play a critical role in the chronic post-ischaemia pain model // Cell Mol Neurobiol. – 2021. – Vol. 41(1). – P. 63-78.
3. Андронати С.А., и др. Лиганды брадикининовых рецепторов как потенциальные альгетические и противовоспалительные средства // Журнал орг. та фарм. хімії. – 2009. – Т. 7, № 4(28). – С. 70-76.
4. Pavlovsky V.I., et al. Analgesic effects of 3-substituted derivatives of 1,4-benzodiazepines and their possible mechanisms // Neurophysiology. – 2013. – Vol. 45. – P. 427-432.
5. Пат. 2701557 РФ. МПК C07D 243/24, A61K 31/5513, A61P 25/04, A61P 25/24, A61P 25/28. Производные 1,4-бензодиазепин-2-она и их применение / В.И. Павловский, В.А. Хазанов, С.А. Станкевич (ООО «Ифар»). Заявлено 24.11.2017; Опубл. 30.09.2019, Бюл. № 28. – 34 с.

УДК 616-092.9

**РОЛЬ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС
ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ**Ю.Г. Бирулина, Е.Е. Буйко, Н.А. ЧернышовНаучный руководитель: доцент, к.б.н., Ю.Г. Бирулина
Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050E-mail: birulina.jg@ssmu.ru**THE ROLE OF THE THIOL-DISULPHIDE SYSTEM IN THE ADIPOSE TISSUE
OF RATS WITH METABOLIC SYNDROME**Yu.G. Birulina, E.E. Buyko, N.A. ChernyshovScientific Supervisor: Assoc. Prof., PhD., Yu.G. Birulina
Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow Trakt str., 2, 634050E-mail: birulina.jg@ssmu.ru

Abstract. *The functional state of the components of the glutathione-dependent antioxidant system in the adipose tissue of rats with experimental metabolic syndrome (MS) was studied. The MS model was carried out on male Wistar rats using a high-fat, high-carbohydrate diet (HFHCD). It was found that HFHCD led to an increase in body weight, obesity, hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia in the experimental group of rats. The level of total glutathione in the adipose tissue of the experimental group rats decreased mainly due to a decrease in the level of reduced glutathione (GSH). The rats receiving HFHCD also showed a decrease in the activity of glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase, but the activity of glutathione reductase increased.*

Введение. Метаболический синдром (МС) представляет собой группу маркеров кардиометаболического риска, ассоциированных с инсулинорезистентностью и ожирением [1]. Существует прямая связь между хроническим воспалением, индуцированным клетками жировой ткани, и развитием окислительного стресса [2]. Функционирование на определенном уровне внутриклеточных механизмов антиоксидантной защиты обеспечивает динамическое равновесие системы генерации свободных радикалов [3]. Одним из ключевых механизмов, обеспечивающим поддержание клеточного редокс-баланса, является система глутатиона, звено тиол-дисульфидного гомеостаза, включающая восстановленную (GSH) и окисленную (GSSG) формы трипептида, а также глутатион-зависимые ферменты (глутатионредуктазу, глутатионпероксидазу, глутатион-S-трансферазу) [4]. Сведения о ее роли в контроле окислительно-восстановительного равновесия в клетках жировой ткани немногочисленны. В связи с этим, целью исследования явилось изучение состояния компонентов системы глутатиона в жировой ткани крыс при экспериментальном МС.

Экспериментальная часть. Модель МС была воспроизведена на крысах Wistar (23 самца, возраст на начало исследования 6 недель). Протокол исследования был одобрен Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных (IACUC) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол №1 от 25.04.2022 г.). Животные были распределены на контрольную (n = 11) и экспериментальную (n = 12) группы. Крысы контрольной группы получали стандартный корм («Дельта

Фидс», Биопро, РФ) со свободным доступом к пище и воде. Крысы экспериментальной группы в течение 12 недель находились на высокожировой и высокоуглеводной диете (ВЖВУД) с заменой питьевой воды на 20% раствор фруктозы. Животных выводили из эксперимента CO₂-эвтаназией. Выполняли забор крови из сердца, которую затем центрифугировали (2000 g, 10 мин) для получения сыворотки. Извлекали и взвешивали висцеральную жировую ткань, фрагменты эпидидимальной жировой ткани замораживали в жидком азоте. В сыворотке крови определяли концентрацию глюкозы (Glucose-TR, Chronolab, Испания), триацилглицеролов (ТАГ), холестерина (ХС) (Триглицериды; Холестерин, Ольвекс Диагностикум, РФ), инсулина (Insulin Rat ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, США). Индекс НОМА-IR рассчитывали как (сывороточный инсулин)*(сывороточная глюкоза)/22,5. Содержание АФК в эпидидимальной жировой ткани определяли флуоресцентным методом с помощью микропланшетного ридера (Infinite 200 Pro M-plex, Tecan, Швейцария). Для определения содержания GSH и GSSG жировую ткань после размораживания (100 мг) гомогенизировали в 5% растворе сульфосалициловой кислоты, затем центрифугировали при 15000 g (2-4°C, 15 мин), собирали супернатант. Принцип метода определения основан на взаимодействии GSH с ДТНБ с образованием тио-2-нитробензойной кислоты, при этом образуется GSSG, который восстанавливается глутатионредуктазой. Результаты представляли в нмоль/мг белка. Активность глутатионредуктазы оценивали по кинетике изменения концентрации тио-2-нитробензойной кислоты в присутствии НАДФН₂ на спектрофотометре СФ-2000 (Спектр, РФ) при длине волны 412 нм. Глутатионпероксидазную активность определяли по скорости окисления НАДФН₂ при длине волны 340 нм. Активность глутатион-S-трансферазы оценивали по скорости реакции образования глутатион-S-конъюгатов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом при длине волны 340 нм. Активность ферментов выражали в нмоль/(мин*мг белка). Количественное определение белка выполняли в реакции с бицинониновой кислотой (BCA Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich, США). Статистическую обработку данных проводили в программе SPSS Statistics 23. Данные, подчиняющиеся нормальному закону распределения, представлены в виде среднего (M) и стандартного отклонения (\pm SD), неподчиняющиеся – медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (Q25; Q75). Анализ различий между выборками выполняли при помощи t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. ВЖВУД вызывала увеличение массы тела, удельной массы висцеральной жировой ткани, уровня глюкозы, инсулина, ТАГ и ХС в сыворотке крови крыс опытной группы. Величина индекса инсулинорезистентности НОМА-IR у крыс с диет-индуцированным МС статистически значимо превышала таковую у группы контроля (таблица 1).

Таблица 1

Изменение физиологических и биохимических показателей у крыс при МС

Параметр	Группа	
	Контрольная (n = 11)	Экспериментальная (n = 12)
Масса тела, г	433,32 \pm 39,4	489,1 \pm 47,9*
Удельная масса жировой ткани, г	2,4 \pm 0,8	3,7 \pm 0,9*
Инсулин, пмоль/л	11,3 \pm 1,9	22,2 \pm 2,6*
Глюкоза натощак, ммоль/л	5,5 \pm 0,4	7,4 \pm 0,8*
НОМА-IR	0,4 \pm 0,1	1,1 \pm 0,3*
ХС, ммоль/л	1,8 \pm 0,3	2,5 \pm 0,6*
ТАГ, ммоль/л	0,9 \pm 0,2	1,6 \pm 0,4*

* - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Уровень АФК в эпидидимальной жировой ткани крыс с диет-индуцированным МС в 1,4 раза превышал значение в контрольной группе животных (таблица 2). Уровень общего глутатиона в жировой ткани крыс с экспериментальным МС статистически значимо снижался в 1,5 раза по сравнению с аналогичным показателем у крыс контрольной группы, что главным образом, было обусловлено снижением содержания GSH. При этом у животных опытной группы отмечалось статистически значимое повышение содержания GSSG (таблица 2). Развитие метаболических нарушений при ВЖВУД приводило к снижению активности глутатион-зависимых ферментов антиоксидантной защиты глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы (таблица 2) в клетках жировой ткани крыс, но, напротив, вызывало повышение глутатионредуктазной активности.

Таблица 2

Содержание общего глутатиона, активность глутатион-зависимых ферментов и уровень активных форм кислорода в жировой ткани крыс при МС

Параметр	Группа	
	Контрольная (n = 11)	Экспериментальная (n = 12)
GSH+GSSG, нмоль/мг белка	9,5(8,1;9,8)	6,4(5,7;7,4)*
GSH/GSSG	24,9(21,5;28,0)	11,6(9,2;13,4)*
GSH, нмоль/мг белка	8,5(7,5;10,7)	5,5(4,0;7,1)*
GSSG, нмоль/мг белка	0,3(0,2;0,4)	0,6(0,5;0,9)*
Глутатионредуктаза, нмоль/(мин*мг белка)	31,9(26,5;35,5)	45,2(41,1;60,1) *
Глутатионпероксидаза, нмоль/(мин*мг белка)	154,1(143,1;174,9)	139,4(105,9;151,6)*
Глутатион-S-трансфераза, нмоль/(мин*мг белка)	397,3(293,3;555,3)	227,9(145,6;291,1)*
АФК, усл. ед.	1,8(1,3;2,2)	2,4(2,1;2,6)*

* - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Заключение. Ожирение, как ключевой компонент МС, является триггером для формирования инсулинорезистентности, хронического вялотекущего воспаления с системными проявлениями, в том числе, за счет реакций окислительного стресса. Установлено, что избыточное накопление висцерального жира у крыс на фоне ВЖВУД приводит к сдвигу окислительно-восстановительного баланса адипоцитов в сторону усиления их прооксидантной активности в совокупности с угнетением глутатион-зависимой антиоксидантной системы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20039, <https://rscf.ru/project/22-25-20039/> и средств Администрации Томской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bremer A.A. Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome // Journal of Obesity – 2013. – Vol. 2013. – P. 393192.
2. Monserrat-Mesquida M., et al. Metabolic Syndrome Is Associated with Oxidative Stress and Proinflammatory State // Antioxidants. – 2020. – Vol. 9(3). – P. 236.
3. Taherkhani S., et al. A Brief Overview of Oxidative Stress in Adipose Tissue with a Therapeutic Approach to Taking Antioxidant Supplements // Antioxidants (Basel). – 2021. – Vol. 10(4). – P. 594.
4. Picklo M.J., et al. Glutathionyl systems and metabolic dysfunction in obesity // Nutrition Reviews. – 2015. – Vol. 73(12). – P. 858-868.

УДК 615.076.7

**СРАВНЕНИЕ *IN VITRO* КОНЬЮГАТОВ АФФИБОДИ ДЛЯ HER-2 ТЕРАПИИ, СОДЕРЖАЩИХ
АЛЬБУМИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН И ПОЛИПЕПТИД PAS**

В.В. Боденко

Научный руководитель: профессор, д.фарм.н. М.В. Белоусов
Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050
E-mail: bodenkovitalina@gmail.com

***IN VITRO* COMPARISON OF HER-2 TARGETING AFFIBODY CONJUGATES FUSED WITH AN
ALBUMIN BINDING DOMAIN AND A PAS POLYPEPTIDE**

V.V. Bodenko

Scientific Supervisor: Prof., Dr. M.V. Belousov
Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050
E-mail: bodenkovitalina@gmail.com

Abstract. *In this study, we conducted an in vitro study comparing the potential of targeted therapeutic drugs containing a cytotoxic agent mc-DM1. The therapeutic potential of using an HER2-targeting Affibody molecule fused to an albumin-binding domain (ABD) to increase half-life and conjugated to the cytotoxic maytansine derivative, MC-DM1, has previously been confirmed. In this study, we also investigated the potential of a targeted therapeutic conjugate that includes an Affibody molecule targeting HER2 and the cytotoxic agent MC-DM1, and the PAS600 polypeptide was the hallmark of the drug design. PAS polypeptides represent a novel class of biosynthetic polymers comprising repetitive sequences of the small proteinogenic amino acids L-proline, L-alanine and/or L-serine. In this study, PAS600 used to increase the half-life of the drug. We conducted in vitro studies comparing the potential of the new (HE)₃ZHER2-Cys/DM1-PAS600 variant molecule with the previously studied (HE)₃ZHER2-ABD-Cys/DM1 molecule.*

Введение. Таргетные терапевтические лекарственные препараты, содержащие в своем составе молекулу аффибоди в качестве молекулы для таргетной доставки и цитотоксический агент, представляют собой новый класс сильнодействующих биофармацевтических препаратов, разработанных для преодоления резистентности к традиционной таргетной терапии и снижения нецелевой токсичности. Молекулы аффибоди (*Affibody, Inc.*) представляют собой каркасные белки малого размера (6–7 кДа) [1], которые можно сконструировать таким образом, чтобы они связывались с желаемыми мишенями с высокой аффинностью. В настоящее время молекулы аффибоди связываются с высокой аффинностью с несколькими молекулярными мишенями, связанными с раком, такими как рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор 3 эпидермального фактора роста человека (HER3), инсулиноподобный рост [2-4]. Однако важной проблемой для доставки полезной нагрузки с использованием небольших белков, таких как молекулы аффибоди, является быстрая экскреция почками [5]. Короткий период полувыведения *in vivo* может снизить активность и ухудшить соблюдение пациентом режима лечения из-за необходимости более частых

назначений. Одним из решений существующей проблемы является включение альбумин-связывающего домена (ABD) в конструкцию терапевтического препарата для продления периода полувыведения из плазмы крови за счет его связывания с сывороточным альбумином [1, 5].

Ранее был подтвержден терапевтический потенциал использования молекулы аффибоди (*Affibody, Inc.*), нацеленной на HER2, слитой с альбумин-связывающим доменом (ABD) и конъюгированной с цитотоксическим производным майтанзина MC-DM1 [1, 5, 3]. В данном исследовании мы также рассмотрели потенциал таргетного терапевтического конъюгата, в состав которого входит молекула аффибоди (*Affibody, Inc.*), нацеленной на HER2 и цитотоксический агент MC-DM1, но отличительным звеном в конструкции препарата являлся полипептид PAS600, используемый для увеличения периода полувыведения препарата из плазмы крови. PAS – новый класс биосинтетических полимеров. PAS600 представляет собой полипептид, содержащий повторяющиеся генетически кодируемые последовательности малых протеиногенных аминокислот L-пролина, L-аланина и/или L-серина. Данные аминокислотные последовательности образуют нативную неструктурированную полипептидную цепь с высокой растворимостью и отсутствием заряда. Кроме того, они биоразлагаемы, что позволяет избежать накопления в органах, при этом проявляя стабильность в сыворотке и отсутствие токсичности или иммуногенности у мышей [6-8]. Мы провели исследования *in vitro*, в ходе которых сравнили потенциал новой молекулы варианта (HE)₃-ZHER2-Cys/DM1-PAS600 с ранее исследованной молекулой (HE)₃-ZHER2-ABD-Cys/DM1. Эффективная интернализация DM1-конъюгатов является важным свойством, поскольку создает предпосылки для внутриклеточного высвобождения лекарственного средства и блокирования полимеризации тубулина [3, 4].

Экспериментальная часть. Для проведения исследования *in vitro* оба терапевтических варианта с цитотоксическими агентами предварительно были мечены ^{99m}Tc. Для сайт-специфического радиоактивного мечения элюированный пертехнетат, ^{99m}TcO₄⁻ (400–500 мкл) из ⁹⁹Mo/^{99m}Tc генератора был добавлен в набор CRS (PSI, Villigen, Швейцария) для получения (^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃). Смесь осторожно встряхивали и инкубировали при 100 °C в течение 30 мин. После инкубации 50 мкл раствора трикарбонилтехнеция нейтрализовали 150 мкл соляной кислоты. Полученный раствор добавляли в пробирку, содержащую 60 мкг (HE)₃-ZHER2-Cys/DM1-PAS600 в 30 мкл PBS или 30 мкг (HE)₃-ZHER2-ABD-Cys/DM1 в 28 мкл PBS, и инкубировали в течение 60 мин при 60 °C. Для очистки исследуемых вариантов с радиоактивной меткой смесь пропускали через колонку эксклюзионной гелевой фильтрации NAP-5 (GE Healthcare), предварительно уравновешенную PBS, и элюировали раствором PBS. Радиохимический выход и чистоту конъюгатов определяли с использованием полосок ITLC (150–771 DARK GREEN Tec-Control Chromatography strips (Biodex Medical Systems, Ширли, штат Нью-Йорк, США), элюированных PBS, и измеряли с использованием системы Cyclone Storage Phosphor System (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Для теста интернализации HER-2 экспрессирующие клетки SKOV3 и BT474 высевали в чашки петри за сутки до эксперимента, по три чашки на каждую часовую точку. Среду удаляли с последующим добавлением ^{99m}Tc-меченых конъюгатов в культуральную среду (2 нМ). Клетки инкубировали при 37 °C. Далее в часовые точки (1, 2, 4, 6 и 24 ч) собирали среду, промывали охлажденным льдом PBS (1 мл). Добавляли к клеткам на льду 0,2 М глициновый буфер для сбора активности, связанной с клеточной мембраной. Далее к клеткам добавляли 1 М раствор NaOH (1 мл) на 30 мин при

37 °С. Клеточный слой, содержащий интернализированную активность, собирали скребком, чашки промывали тем же буфером (1 мл), который далее собирали. Активность собранной среды, связанную с мембраной активность и интернализированную активность измеряли с использованием автоматического гамма-спектрометра (1480 Wizard, Wallac, Finland).

Результаты. Оба варианта (HE)₃-ZHER2-Cys/DM1-PAS600 и (HE)₃-ZHER2-ABD-Cys/DM1 были эффективно мечены ^{99m}Tc (радиохимический выход составлял 81–93 %). Радиохимическая чистота после очистки эксклюзионной хроматографией составила > 99 %. Проведенный тест интернализации *in vitro* показал, что для каждого исследуемого варианта ассоциированная с клеткой активность и интернализированная активность увеличивались со временем. Интернализированная активность через 24 часа для вариантов (HE)₃-ZHER2-Cys/DM1-PAS600 и (HE)₃-ZHER2-ABD-Cys/DM1 составляла 29 % и 35 % от общей клеточно-ассоциированной активности в клетках SKOV3 и 16 % и 27 % в клетках BT474 соответственно.

Заключение. Исходя из результатов выполненного исследования, мы приходим к такому выводу, что радиокатаболиты как варианта (HE)₃-ZHER2-Cys/DM1-PAS600, так и (HE)₃-ZHER2-ABD-Cys/DM1 не диффундируют через клеточные мембраны и остаются внутри клеток после HER2-опосредованного эндоцитоза и деградации белка в лизосомах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Altai M. Affibody-derived drug conjugates: Potent cytotoxic molecules for treatment of HER2 over-expressing tumors // *J. Control. Release.* – 2018. – № 288. – P. 84-95.
2. Tolmachev V. Radionuclide Therapy of HER2-Positive Microxenografts Using a ¹⁷⁷Lu-Labeled HER2-Specific Affibody Molecule // *Cancer Res.* – 2007. – № 67. – P. 2773-2782.
3. Xu T. Effect of Inter-Domain Linker Composition on Biodistribution of ABD-Fused Affibody-Drug Conjugates Targeting HER2 // *Pharmaceutics.* – 2022. – V. 3., № 14. – P. 522.
4. Liu Y. Biologic Evaluation of a Heterodimeric HER2-Albumin Targeted Affibody Molecule Produced by Chemo-Enzymatic Peptide Synthesis // *Pharmaceutics.* – 2022. – V. 11., №14. – P. 2519.
5. Ding H. Incorporation of a Hydrophilic Spacer Reduces Hepatic Uptake of HER2-Targeting Affibody-DM1 Drug Conjugates // *Cancers.* – 2019. – V. 11., № 8. – P. 1168.
6. Gebauer M. Prospects of PASylation® for the design of protein and peptide therapeutics with extended half-life and enhanced action // *Bioorg Med Chem.* – 2018. – V. 10., № 26. – P. 2882-2887.
7. Schiefner A. Proline/alanine-rich sequence (PAS) polypeptides as an alternative to PEG precipitants for protein crystallization // *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* – 2020. – № 76. – P. 320-325.
8. Schlapschy M. PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins // *Protein engineering, design & selection: PEDS.* – 2013. – V. 8., № 26. – P. 489-501.

УДК 615.281:577.112.6

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКОГО
ПЕПТИДОМИМЕТИКА КАМП-1**Е.А. Бондарева^{1,2}, М.С. Солдатова², Е.М. Любушкина¹Научные руководители: профессор, д.м.н., А.Н. Евстропов¹, доцент, д.м.н., П.Г. Мадонов^{1,2}¹Новосибирский государственный медицинский университет,

Россия, г.Новосибирск, Красный проспект, 52, 630091

²НИИКЭЛ филиал ФИЦ ИЦИГ СО РАН лаборатория фармакологически активных соединений,

Россия, г.Новосибирск, ул. Арбузова,6, 630117

E-mail: elena.bondarewa@mail.ru

STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SYNTHETIC PEPTIDOMIMETIC SAMP-1E.A. Bondareva^{1,2}, M.S. Soldatova², E.M. Lubushkina¹Scientific supervisors: Prof., Dr., A.N. Evstropov¹, Assoc. Prof., Dr., P.G. Madonov^{1,2}¹Novosibirsk State Medical University, Russia, Novosibirsk, Krasny ave., 52, 630091²NIKEL Branch of FRC ICG SB RAS Laboratory of Pharmacologically Active Compounds, Russia,

Novosibirsk, Arbuzova str., 6, 630117

E-mail: elena.bondarewa@mail.ru

Abstract. *In this work, we studied the in vitro antimicrobial activity of the SAMP-1 synthesized in the Laboratory of Pharmacological Active Compounds of the NIKEL Branch of the Federal Research Center of the Institute of Cytology and Geochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences against four cultures of microorganisms S.aureus, E.coli, B.cereus, and P.aeruginosa. The minimum bacteriostatic concentration for each test culture was determined by the method of serial dilutions of the test substance. The ability of the peptide to diffuse in a dense nutrient medium and its stability during dilution and storage were studied. A higher antibacterial activity of the synthetic peptide SAMP-1 against grampositive cultures of Staphylococcus aureus and (or) Bacillus cereus was revealed compared to gramnegative Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. The peptide solution demonstrated the ability to diffuse in the gel with the formation of zones of growth inhibition of test cultures and the preservation of the constancy of antimicrobial properties during storage for 3 months, which determines the prospects for further studies of the biological activity of the synthetic peptide.*

Введение. Неблагоприятные тенденции течения инфекционных заболеваний в мире наблюдаются из-за распространение клинических изолятов, обладающих отсутствием чувствительности ко многим классам антимикробных препаратов. Количество невосприимчивых штаммов среди оппортунистических микроорганизмов, таких как *S. aureus*, *E.coli*, постоянно возрастает. Частота встречаемости MRSA-изолятов *S. aureus* среди внутрибольничных штаммов в России составляет 24,9 %. Невосприимчивость к цефалоспорином среди штаммов *E.coli* насчитывает выше 60 %, в том числе к цефалоспорином третьего поколения. Так же проблему составляет множественная лекарственная устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* в связи с возможностью формирования резистентных к антибиотикам клеток-персистеров, что в свою очередь влечет за собой рецидив инфекций. Поэтому

остается востребованным поиск новых эффективных действующих веществ и лекарственных форм. Интерес вызывают антимикробные пептиды, демонстрирующие широкий спектр проявлений биологической активности, в том числе и антибактериальные свойства [1-6] Одним из представителей является пептидомиметик на основе модифицированных триптофана и аргинина – КАМП-1.

Цель работы: изучить способность синтетического пептидомиметика КАМП-1 проявлять антибактериальные свойства, сохранять их при длительном хранении в виде раствора, а также его способность к диффузии в плотной среде.

Экспериментальная часть. Изучалась активность синтетического пептида КАМП-1 кристаллической формы, полученного в лаборатории фармакологических активных соединений НИИКЭЛ филиала ФИЦ ИЦИГ СО РАН. Применялся метод серийных разведений КАМП-1 в жидкой питательной среде. Так же тестировалась стабильность его растворенной формы спустя 3 месяца хранения при температуре +4 °С без доступа света. В качестве тест-культур использовались штаммы *S. aureus* ATCC 6538 FDA 209P в дозе $(6,39 \pm 0,87) \times 10^3$ КОЕ, *E. coli* ATCC 25922 - $(6,61 \pm 0,70) \times 10^3$ КОЕ, *B. cereus* ATCC 10702- $(6,5 \pm 0,76) \times 10^3$ КОЕ и *P. aeruginosa* ATCC 9027- $(6,06 \pm 1,11) \times 10^3$ КОЕ. Посевная доза суточной культуры бактерий определялась по стандарту Mc Farland и контролировалась высевом на плотную питательную среду с дальнейшим подсчетом количества колониеобразующих единиц (КОЕ). Наименьшая доза вещества, при которой наблюдалось полное подавление роста тест-культуры, считалась минимальной подавляющей концентрацией (МПК). Для постановки опыта дискодиффузии были изготовлены с соблюдением правил асептики целлюлозные диски диаметром 5мм, содержащие 5 мг/л, 2,5 мг/л и 0,5 мг/л активного вещества. Для приготовления инокулюма готовили стандартные суспензии из суточных культур каждого штамма на физиологическом растворе оптической плотностью 0,5 (содержание около $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Инокулюм использовали в течение 15 минут. На поверхность чашки Петри с питательной средой Мюллер-Хинтон производили посев газонем тест-культур. После подсушивания в течение 15 минут приготовленных чашек на поверхность агара накладывали диски, пропитанные разными концентрациями исследуемого вещества на расстоянии 2 см от края чашки и на равном расстоянии друг от друга. Чашки инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24 часов. Противомикробную активность определяли по диаметру зоны задержки роста. Средний показатель и его стандартная ошибка рассчитывалась по результатам повторных опытов (SEM).

Результаты. Образец синтетического пептидомиметика КАМП-1 проявил антибактериальную активность в отношении всех используемых тест-культур. Наименьший показатель МПК был отмечен для культур грамположительных бактерий. Так, для *S. aureus* и *B. cereus* МПК КАМП-1 составила порядка 6,6 мг/л. Тогда как для подавления роста грамотрицательных потребовалась более высокая концентрация исследуемого пептида: МПК для *E.coli* – 8,4 мг/л, а для *P.aeruginosa* значение МПК оказалось максимальным и составило 60 ± 21 мг/л. Различия в результатах антибактериальной активности между свежеприготовленным раствором исследуемого пептидомиметика и раствором подвергнутому хранению, оказались незначительными. Результаты приведены в таблице 1. Раствор исследуемого пептидомиметика способен к диффузии в агаре. Так, задержка роста, при концентрации в дозе 5 мкг/мл наблюдались для всех тестовых культурах. Наибольший диаметр зоны задержки роста был отмечена для *S. aureus* (10мм), *B. Cereus* (9 мм), для *E. coli* – 8 мм и *P. aeruginosa* – 7 мм. Пептид в концентрации 2,5 мг/л практически не показал активности в отношении *B. cereus* – 5,5 мм и *P. aeruginosa* – 0мм,

Разведение исследуемого вещества 0,5 мг/л показал незначительный эффект только в отношении *S. aureus* – 5,5мм. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 1

Минимальная подавляющая концентрация (МПК) КАМП-1

Бактериальные культуры	КАМП-1 extempore раствор, МПК (мг/л)	КАМП-1 раствор после хранения, МПК (мг/л)
<i>S.aureus</i>	6,67 ± 1,67	6,54 ± 1,67
<i>B.cereus</i>	6,67 ± 1,67	6,54 ± 1,67
<i>E.coli</i>	8,33 ± 1,67	8,47 ± 1,67
<i>P.aeruginosa</i>	60 ± 20,82	58 ± 20,82

Таблица 2

Антимикробная активность КАМП-1 методом дискодиффузии в агар

Тест-культуры бактерий	Диаметр зоны задержки роста (мм)		
	5 мг/л	2,5 мг/л	0,5 мг/л
<i>S.aureus</i>	10 ± 1	9 ± 1	5,5 ± 0,5
<i>B.cereus</i>	9 ± 1	5,5 ± 0,5	-
<i>E.coli</i>	8 ± 1	7 ± 1	-
<i>P.aeruginosa</i>	7 ± 1	-	-

Заключение. Пептидомиметик КАМП-1, полученный путем химического синтеза, проявляет антибактериальные свойства. Активность синтетического пептида КАМП-1 *in vitro* в отношении грамположительных бактерий была выше, по сравнению с грамотрицательными микробами. Раствор исследуемого вещества обладает стабильностью и способен длительно сохранять свои антимикробные свойства при хранении, а также обладает возможностью диффузии в плотную питательную среду. КАМП-1 является перспективным активным фармакологическим ингредиентом для создания на его основе лекарственного препарата и в качестве антибактериального компонента для изделий медицинского назначения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Искакова Н.С. и др. Информированность населения различных стран по вопросам использования антибиотиков. Обзор литературы //Наука и здравоохранение. – 2021. – №. 2. – С. 51-57.
- Мусин Х.Г. Антимикробные пептиды-потенциальная замена традиционным антибиотикам // Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8. – №. 3. – С. 295-308.
- Guo Y. et. al. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in Staphylococcus aureus // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2020. – Vol. 10. – P. 107.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2018 [Electronic Resource]. – Access mode: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2018.pdf> (дата обращения 04.06.2022).
- Pormohammad A., Nasiri M.J., Azimi T. Prevalence of antibiotic resistance in Escherichia coli strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis // Infection and drug resistance. – 201. – Vol. 12. –P. 1181-1197.
- Pang Z, et al. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies // Biotechnol Adv. – 2019. – Vol. 37(1). – P. 177-192.

УДК 004.925.84:615.4:616.34

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОСПАЕЧНЫХ СВОЙСТВ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ИМПЛАНТАТОВ,
ИЗГОТОВЛЕННЫХ ИЗ ФТОРПОЛИМЕРА МЕТОДОМ 3D ПЕЧАТИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
В КАЧЕСТВЕ ЭНДОПРОТЕЗА ДЛЯ ГЕРНИОПЛАСТИКИ**

А.О. Воробьев, А.Е. Лейман

Научный руководитель: к.т.н., Е.Н. Больбасов, д.м.н., Е.Ю. Варакута
Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050
E-mail: aov4@tpu.ru

**THE STUDY OF ADHESIVE PROPERTIES OF 3D PRINTED INDIVIDUAL IMPLANTS MADE
OF FLUOROPOLYMER FOR USE AS ENDOPROSTHESIS FOR HERNIOPLASTY**

A.O. Vorobyev, A.E. Leiman

Scientific Supervisor: PhD., E.N. Bolbasov, Dr., E.Y. Varakuta
Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050
E-mail: aov4@tpu.ru

***Abstract.** In the presented study, personalized polymeric adhesion barrier was fabricated of a copolymer of vinylidene fluoride with tetrafluoroethylene (VDF-TeFE) via 3D fused deposition modeling (FDM) technology. Investigation with the use of 3T3L1 fibroblast cell culture confirms that fabricated membranes do not produce cytotoxic compounds. In vivo study shows that VDF-TeFE membranes are highly biocompatible, bioinert, do not cause inflammatory effect or rejection.*

Введение. Любое повреждение брюшины или наличие инородных тел сопровождается местной воспалительной реакцией и образованием плотной волокнистой соединительной ткани (спаек), которые вызывают хронические боли в животе и кишечную непроходимость [1]. Сегодня, практикующие хирурги для герниопластики используют сетчатые имплантаты из поливинилиденфторида (ПВДФ) и полипропилена (ПП). Основными недостатками таких имплантатов является высокий риск развития спаечной болезни брюшной полости, что значительно ухудшает качество жизни пациентов, приводя к хроническим тазовым болям, а также провоцирует развитие отдалённых хирургических осложнений, таких как странгуляционная кишечная непроходимость и перитонит. Решением существующих проблем стандартных сетчатых имплантатов, является изготовление индивидуальных имплантируемых изделий методами 3D печати. Перспективным отечественным полимером для изготовления индивидуальных сетчатых имплантатов для профилактики спаечной болезни является сополимер винилиденфторида с тетрафторэтиленом (ВДФ-ТеФЭ). Однако в настоящее время в научно-технической литературе отсутствуют данные о влиянии размера пор на интеграцию имплантатов, изготовленных по технологии 3D печати из сополимера ВДФ-ТеФЭ с нативными тканями, что затрудняет клиническое использование этих перспективных медицинских изделий. Таким образом основной целью настоящего исследования стало изучение влияния размера пор на взаимодействие с тканями брюшной полости индивидуального имплантата из сополимера ВДФ-ТеФЭ изготовленных методом 3D печати.

Экспериментальная часть. Используя технологию 3D печати, были изготовлены индивидуальные имплантаты из сополимера ВДФ-ТеФЭ в виде тонких эндопротезов 70x40 толщиной 0.3 мм. Для изготовления имплантов использовали следующие параметрах печати: диаметр сопла – 0,3 мм, температура сопла – 230 °С, температура стола – 60 °С, скорость печати – 10 мм/с, высота слоя – 250 мкм, плотность заполнения – 50 %, структура заполнения – гироид. Основные сведения о структуре и размере пор эндопротезов, напечатанных на 3D-принтере, показаны на рисунке 1.

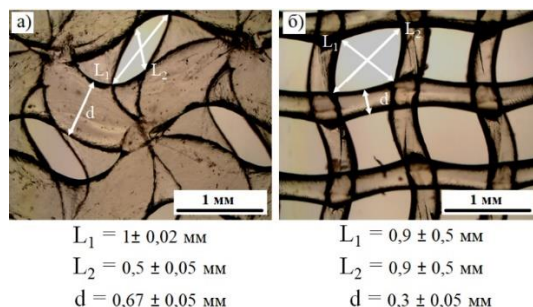


Рис. 1. Внутренняя архитектура эндопротезов для герниопластики изготовленных медом 3D печати из сополимера ВДФ-ТеФЭ: а) эндопротез № 1; б) эндопротез № 2

Стерилизацию имплантата проводили в паровом автоклаве (Tuttnauer, Германия) при температуре 120 °С в течении 40 мин при давлении – 2 атм. Изучение цитотоксичности эндопротезов для герниопластики проводили с использованием фибробластов линии 3T3L1. Имплантацию разработанных подготовленных индивидуальных сеток осуществляли на внутреннюю поверхность передней брюшной стенки кроликам породы шиншилла. На 21 сутки после имплантации животных выводили из эксперимента, фиксировали место имплантации на цифровую камеру, забирали окружающие ткани вместе с имплантатом для проведения гистологических исследований.

Результаты. Исследования жизнеспособности и пролиферативной активности *in vitro* демонстрируют, что эндопротезы, изготовленные из сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом (ВДФ-ТеФЭ) как до, так и после стерилизации не содержат токсичных соединений способных экстрагироваться в питательную среду и подавлять рост культуры фибробластов 3T3L1, о чем свидетельствует отсутствие достоверных отличий в показателях между контрольной и исследуемыми группами на всех сроках наблюдения (Рис. 2).

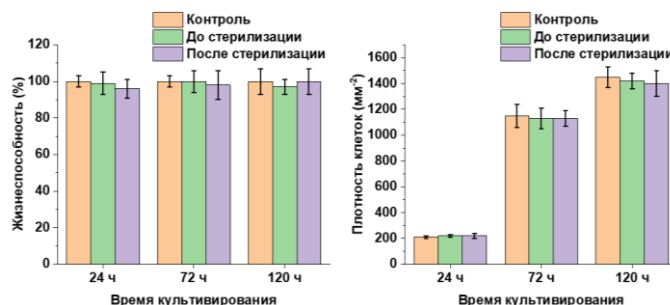


Рис. 2. Жизнеспособность фибробластов при культивировании в экстрактах изготовленных эндопротезов для герниопластики

Результаты *in vivo* показали, что исследуемые эндопротезы для герниопластики успешно адгезировались к тканям передней брюшной стенки, однако в зависимости от размера пор, механизм

интеграции мембран отличается. Из-за низкой пористости, эндопротез № 1 адгезировалась к окружающим тканям за счет фиброзной инкапсуляции без их интеграции в структуру имплантата, в то время как развитая открытая пористость эндопротеза № 2 позволила окружающим тканям интегрироваться в его структуру. Со стороны внутренних органов наблюдалось образование тонких тяжей, размер которых составлял до 1 x 3 мм, и нежных прозрачных пленок соединительной ткани, которые разрывались самопроизвольно при аутопсии и поддавались диссекции тупым путем (Рис. 3). Прилежащая к эндопротезу париетальная и висцеральная брюшины имели физиологическую окраску, свободной жидкости в брюшной полости не было обнаружено.

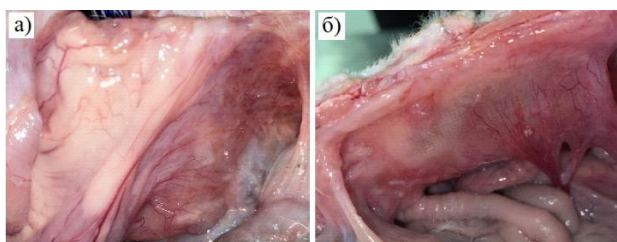


Рис. 3. Изображение интеграции тканей с исследуемыми мембранами с разной пористостью: а) эндопротез № 1; б) эндопротез № 2

Гистологическое исследование образцов тканей (мышцы передней брюшной стенки, эндопротез с окружающей его соединительной тканью, спайки, участок кишки вместе контакта со спайкой), взятых в области имплантации эндопротеза представлены на рисунке 3. На микроскопическом уровне обнаружены организованные пучки плотной волокнистой соединительной ткани с развитой капиллярной сетью.

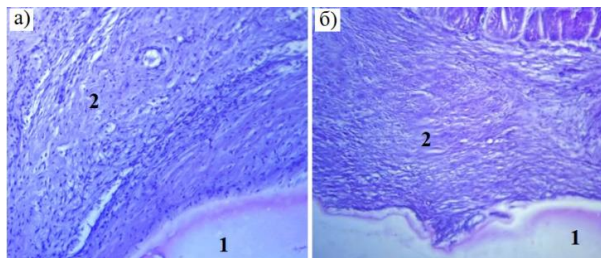


Рис. 4. Гистология образцов тканей в месте имплантации исследуемых эндопротезов с разной пористостью: а) эндопротез № 1; б) эндопротез № 2. 1 – эндопротез, 2 – соединительная ткань

Заключение. В работе представлена возможность изготовления индивидуальных имплантатов с противоспаечными свойствами для герниопластики методом 3D печати на основе сополимера винилиденфторида. Исследовано влияние размера пор на интеграцию окружающих тканей. Исследование *in vivo* демонстрирует, что все исследуемые мембраны обладают высокой биосовместимостью, инертностью, не вызывает реакций отторжения и выраженного воспаления окружающих тканей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gere S. diZerega, Joseph D. Campeau. Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation // Human Reproduction Update. – 2001. – Vol. 7. – P. 547-555.

УДК: 618.19-006.6:576.3:575.113

**ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМА ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ЛИНИИ
BT549 С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА MYC**

К.А. Гаптулбарова, Е.А. Кравцова, И.А. Цыденова

Научный руководитель: Н.В. Литвяков

НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный 5, 634009

E-mail: xenia.gaptulbarova@yandex.ru

**CHANGE IN THE TRANSCRIPTOME OF THE GENETICALLY MODIFIED LINE
BT549 WITH OVEREXPRESSION OF THE MYC GENE**

K.A. Gaptulbarova., E.A. Kravtsova, I.A. Tsydenova

Scientific Supervisor: N.V. Litvyakov

Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kooperativniy lane, 5, 634009

E-mail: xenia.gaptulbarova@yandex.ru

Abstract. *Breast cancer (BC) is one of the most malignant tumors and the leading cause of cancer-related death in women worldwide. Many previous studies pointed out that tumor heterogeneity is the key to tumorigenesis, metastasis, recurrence and resistance to anti-tumor therapy [1]. And more research is proving that breast tumours contain a small number of cells that have the ability to self-renew and differentiate, namely breast cancer stem cells [1]. Such cells play a key role in the emergence, development and migration of breast tumours. In breast cancer, breast cancer stem cells (BCSCs) are well defined [1,2]. More and more research showed targeting BCSCs is a promising way to cure breast cancer and lots of efforts are devoted to understand the molecular mechanisms of BCSC maintenance and differentiation [3]. For example, overexpression of certain stemness genes can lead to the formation of mammospheres in the tumour and further progression of the disease. So, an in-depth investigation on the molecular mechanisms of BC progression is required for diagnosis, prognosis and therapies.*

Введение. Ранее нами была показана ассоциация способности опухолевых клеток к дедифференцировке до стволовых клеток в зависимости от количества амплификаций генов стволовости, которые обуславливают их гиперэкспрессию. Клеточная линия рака молочной железы BT549 имеет только одну амплификацию гена стволовости *KLF5* и самую низкую из всех стандартных опухолевых линий молочной железы способность к дедифференцировке с образованием маммосфер. С помощью метода CRISPER/Cas9 SAM-активации была получена генетически-модифицированная клеточная линия BT549 с эктопической экспрессией гена *MYC*.

Поэтому целью работы в данном исследовании явилась оценка изменения транскриптома модифицированной линии и ее способности к дедифференцировке по сравнению с исходной.

Экспериментальная часть. Клетки линии BT549 снимали с поверхности пластика с использованием аккутазы, окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами PE-anti-human CD44 и APC-anti-human CD24. Для исследования отбирали CD44-CD24- или CD44- дифференцированные опухолевые клетки на клеточном сортере SH800 (Sony, США). Для экспрессии компонентов системы

SAM были использованы плазмиды: lenti dCas-VP64_Blast (Plasmid #61425), lenti MS2-p65-HSF1_Hygro (Plasmid #61426), lenti sgRNA(MS2)_zeobackbone (Plasmid #61427) (Addgene). Чтобы создать клеточную линию BT549 со стабильной сверхэкспрессией MYC, BT549 высевали в лунки 6-луночного планшета и инфицировали лентивирусными супернатантами; добавляли полибрен (Sigma-Aldrich, США). Через 24 часа после трансдукции среду заменяли свежей средой, содержащей антибиотика. Отбор антибиотиком длился 2 недели. Выделение РНК Набор RNeasy Plus mini Kit. Полнотранскриптомный микроматричный анализ проводился на микрочипах Clariom™ S Assay, human (ThermoFisher Scientific, USA). Анализ данных осуществлялся при помощи программы Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0.

Результаты. Проведено сравнение экспрессионного профиля модифицированной и исходной линий BT549. Гиперэкспрессия белка Мус была подтверждена с помощью антител и по данным микроматричного анализа экспрессия гена *MYC* повышалась в 5 раз, также значительно повышалась экспрессия еще 3 генов стволовости (*SMO*, *GATA3* и *LIFR*) (Рисунок 1).

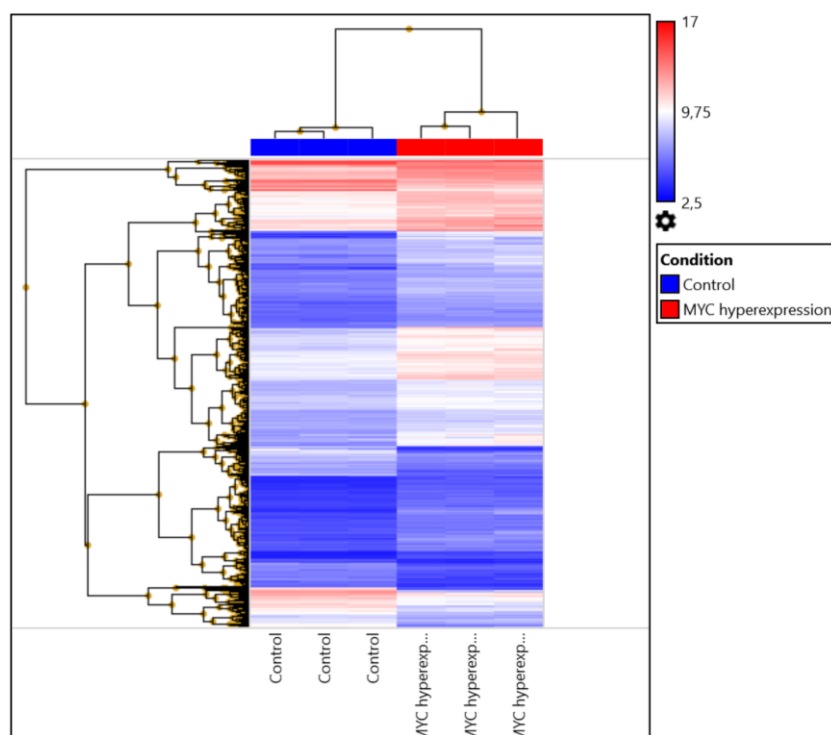


Рис. 1. Тепловая карта экспрессия гена *MYC* в модифицированной линии BT549:

синим цветом – контроль, красным – гиперэкспрессия *MYC*

В модифицированной линии, была повышена (при FoldChange от 2 до 197) экспрессия 2957 генов (почти 2 тыс из них гены –мишени *MYC*) и снижена экспрессия 948 генов при FoldChange от 2 до 378). Топ 10 по FoldChange up-regulated генов (*CSAG1*, *SLC7A2*, *BMP5*, *PDGFRL*, *SULF2*, *MTUS1*, *LGALS1*, *FAM69A*, *LPAR3*, *MSI1*) и топ 10 генов down-regulated (*BMP4*, *CFB*, *PRRX1*, *MX1*, *KRT7*, *OAS1*, *BST2*, *LRRN1*, *TMEM47*, *SRGN*) (Рисунок 2).

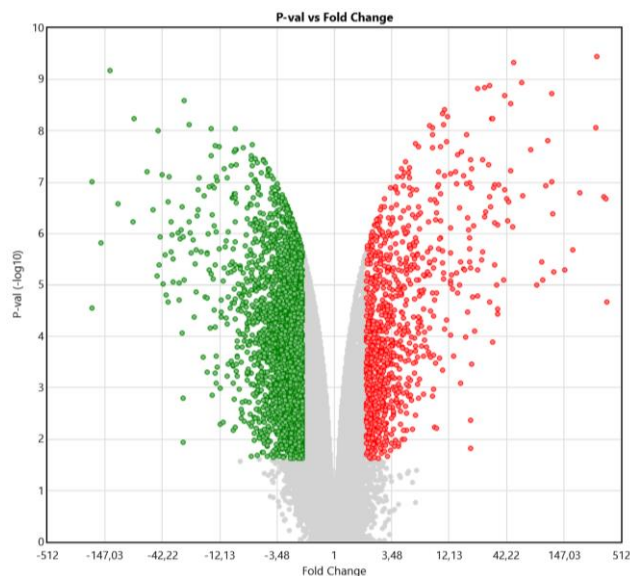


Рис. 2. ДЭГ модифицированной линии BT549: зеленым цветом - Up-regulated, красным - Down-regulated

Топ сигнальных путей (Malignant pleural mesothelioma, VEGFA-VEGFR2 signaling pathway, miR-targeted genes in muscle cell, PI3K-Akt-mTOR-signaling pathway, Chemokine signaling pathway). Кроме генов стволовости для дедифференцировки критически важен WNT-сигналинг. Из 172 генов этого pathway активировалась экспрессия 33 генов, а ингибировалась активность 7 генов. Исходная клеточная линия образовывала единичные маммосферы на лунку, частота маммосфер модифицированной линии колебалась от 7 до 15. Это исследование доказывает критически важную роль эктопической экспрессии генов стволовости, в частности MYC, для способности опухолевых клеток к дедифференцировке.

Заключение. Таким образом, мы наблюдали изменение транскриптомного профиля у клеток модифицированной линии BT549hyperMYC_clone9, в частности, по данным микроматричного анализа наблюдалось значительное повышение экспрессии гена MYC, а также еще трёх генов стволовости SMO, GATA3, LIFR, а вот экспрессия генов KLF5 и SNAI2 была напротив снижена, по сравнению с исходной линией. А активация топовых сигнальных путей (Malignant pleural mesothelioma, VEGFA-VEGFR2 signaling pathway, miR-targeted genes in muscle cell, PI3K-Akt-mTOR-signaling pathway, Chemokine signaling pathway) привела к возможности клеток к дедифференцировке.

Работа поддержана грантом Минобр. РФ 075-15-2021-1073.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang R., Tu J., Liu S. Novel molecular regulators of breast cancer stem cell plasticity and heterogeneity // Seminars in cancer biology. – 2022. – Vol. 82. – P. 11-25.
2. Al-Hajj M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – Vol. 100., №. 7. – P. 3983-3988.
3. Yang L. et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy // Signal transduction and targeted therapy. – 2020. – Vol. 5., №. 1. – P. 8.

УДК 577.114

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ПРОДУЦЕНТОМ
MEDUSOMYCES GISEVII SA-12 НА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТАХ МИСКАНТУСА
СОРТА КАМИС**

Е.К. Гладышева, Е.И. Кашеева, Ю.А. Гисматулина

Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН,
Россия, Алтайский край, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1, 659322

E-mail: evg-gladysheva@yandex.ru

**MICROBIOLOGICAL SYNTHESIS OF BACTERIAL CELLULOSE PRODUCER OF *MEDUSOMYCES
GISEVII SA-12* ON ENZYMATIC HYDROLYSATES OF MISCANTHUS OF THE KAMIS VARIETY**

E.K. Gladysheva, E.I. Kashcheyeva, Y.A. Gismatulina

Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies SB RAS, Russia, Biysk, Socialisticheskaya str., 1,659322

E-mail: evg-gladysheva@yandex.ru

Abstract. *In the conducted study, samples of bacterial cellulose were synthesized for the first time on the nutrient medium of the enzymatic hydrolysate of miscanthus of the KAMIS variety. Previously, the feedstock was subjected to chemical treatment and enzymatic hydrolysis. The output of BC was 7.7 – 13.2 %.*

Введение. Бактериальная целлюлоза (БЦ) – наноматериал, синтезируемый различными видами бактерий, включая роды *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Komagataeibacter*, *Rhizobium* и др. БЦ имеет наноструктуру, которая определяет ее физико-механические свойства, а ее форму можно контролировать в зависимости от типа культивирования. По сравнению с растительной целлюлозой БЦ, представляет собой трехмерную сеть, сплетенную из нановолокон, и также обеспечивает высокую механическую прочность, высокую степень полимеризации и высокую степень кристалличности (около 90 %) и водоудерживающую способность [1]. БЦ востребована в различных отраслях промышленности, но массовому внедрению препятствует высокая себестоимость процесса получения. С целью снижения себестоимости процесса получения проводятся исследования, направленные на поиск решений, направленных на снижение стоимости. Одним из решений проблемы является использование в качестве питательных сред гидролизатов целлюлозосодержащего недревесного сырья. В качестве источника такого вида сырья может быть использована энергетическая культура – мискантус. Мискантус относится к возобновляемым источникам энергии и характеризуется высоким потенциалом урожайности [2]. Однако, замена синтетических питательных сред на альтернативные может привести к изменениям физико-химических свойств конечного продукта. Поэтому целью данного исследования являлось проведение процесса биосинтеза БЦ на ферментативном гидролизате мискантуса сорта КАМИС.

Экспериментальная часть. Мискантус сорта КАМИС подвергался последовательной двухэтапной химической обработке разбавленным раствором азотной кислоты с выделением лигноцеллюлозного материала, а затем разбавленным раствором гидроксида натрия с получением целлюлозы при атмосферном давлении. Химической обработке подвергались растение в целом и отдельно только стебель. Исходное сырье и субстраты, полученные после химической обработки, были проанализированы по

компонентному составу [3]. Ферментативный гидролиз проводился в 0,05 М ацетатном буферном растворе (рН 4,7), начальная концентрация субстрата – 45,0 г/л по сухим веществам, температурный режим – (46±2)°С, продолжительность процесса – 48 ч. Концентрация редуцирующих веществ (РВ) определялась с помощью спектрофотометра Cary-60 с использованием реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты [4]. Биосинтез БЦ проводили в стационарных условиях в климатической камере с использованием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 при температуре 27 °С в оптимальных условиях [5]. После окончания культивирования гель-пленку БЦ снимали с поверхности питательной среды и промывали поэтапной обработкой 2 мас. % NaOH и 0,25 мас. % HCl с последующей промывкой дистиллированной водой до нейтральной реакции. После промывки пленки БЦ подвергали сублимационной сушке HR7000-M. Определение степени полимеризации проводилось по методике [3].

Результаты. В таблице 1 представлены данные по компонентному составу исходного сырья – мискантуса сорта КАМИС стебля отдельно и растения в целом, а также целлюлоз, полученных из него.

Таблица 1

Результаты химического анализа исходного сырья и полученных субстратов

	Массовая доля, %			
	Целлюлоза по Кюршнеру / * α -целлюлоза	Пентозаны	Лигнин	Зола
КАМИС СТЕБЕЛЬ				
Исходное сырье	53,2	19,2	26,2	1,8
Субстрат № 1	97,7*	1,28	0,60	0,2
КАМИС ЦЕЛОЕ РАСТЕНИЕ				
Исходное сырье	50,1	22,0	25,0	1,7
Субстрат № 2	93,8*	3,3	1,0	0,4

Предварительная химическая обработка направлена на разрушение структуры устойчивой сырьевой матрицы, высвобождения целлюлозных и удаления нецеллюлозных компонентов. Из представленных данных видно, что в результате предварительной химической обработки повышается массовая доля гидролизующихся компонентов (α -целлюлоза и пентозаны), а также снижается массовая доля негидролизующихся компонентов (лигнин и зола), которые могут оказывать негативное влияние на ферментативный гидролиз. Следует отметить, что субстраты № 1 и № 2 характеризуются высоким содержанием α -целлюлозы, по сравнению с исходным сырьем. Полученные субстраты подвергали воздействию ферментативных препаратов для получения растворов сахаров, пригодных для биосинтеза БЦ. В результате из субстрата № 1 получены гидролизаты с концентрацией РВ 18,8-19,0 г/л, что составляет 36-38 % от начальной массы субстрата, а из субстрата № 2 получены гидролизаты с концентрацией РВ 20,1-27,0 г/л, что составляет 40,4-53,3 %. Неполная конверсия целлюлозы в РВ предусмотрена выбранным технологическим решением, при котором оставшаяся после ферментативного гидролиза целлюлоза используется для получения нитратов целлюлозы. На успешное проведение процесса биосинтеза БЦ указывает образование гель-пленки БЦ. Для проведения биосинтеза ферментативные гидролизаты разбавляют до оптимальной концентрации РВ 20,0-25,0 г/л, обеспечивающей максимальный выход БЦ. Таким образом, ферментативный гидролизат, полученный через 24 ч из субстрата № 2 был разбавлен до концентрации 20,0 г/л. В процессе биосинтеза БЦ контролировались уровень активной кислотности и конечная концентрация РВ. Излишнее снижение рН свидетельствует о значительном

накоплении уксусной кислоты, что может оказывать негативное влияние на биосинтез БЦ. При проведении данного эксперимента рН изменялось в пределах 4,0-4,5. Высокая концентрация РВ в конце культивирования свидетельствует о низком потреблении и низкой активности продуцента БЦ. В данном опыте концентрация РВ составила менее 2 г/л. Выход БЦ на питательных средах из субстрата № 1 составил 12,2 - 13,2 %, что соответствует данным, полученным на синтетической питательной среде [6]. Результаты, полученные на питательных средах из субстрата № 2 ниже, чем из субстрата № 1, однако тоже являются довольно высокими. Степень полимеризации полученных образцов БЦ (СП БЦ) соответствует данным, полученным при аналогичных исследованиях ранее [6].

Таблица 2

Результаты ферментативного гидролиза и биосинтеза БЦ

Продолжительность гидролиза	Концентрация РВ, г/л / Выход РВ, %	Выход БЦ, %	СП БЦ
Субстрат № 1			
8 ч	18,8 / 36	12,2	1080
24 ч	19,0 / 38	13,2	1070
Субстрат № 2			
8 ч	20,1 / 40,4	7,7	1080
24 ч	27,0 / 53,3	7,7	1280

Заключение. В результате проведенных исследований на питательной среде ферментативного гидролизата мискантуса сорта КАМИС синтезированы образцы БЦ с помощью продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12 с выходом 7,7 – 13,2 % и значениями степени полимеризации 1070-1280.

Работа выполнена при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск) и за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Choi S. M., Rao K.M., Zo S.M., Shin E.J., Han, S.S. Bacterial cellulose and its applications // *Polymers*. – 2022. – Vol. 14., № 6. – P. 1080.
2. Gismatulina Y.A., Budaeva V.V., Kortusov A.N., Kashcheyeva E.I., Gladysheva E.K., Mironova G.F., Skiba E.A., Shavyrkina N.A., Korchagina A.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Evaluation of Chemical Composition of *Miscanthus x giganteus* Raised in Different Climate Regions in Russia // *Plants*. – 2022. – Vol. 11. – P. 2791.
3. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: Учебное пособие для вузов. – М.: Экология, – 1991. – 320 с.
4. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // *Analytical Chemistry*. – 1959. – Vol. 31. – P. 426-428.
5. Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 // *Applied Biochemistry and Microbiology* – 2018. – Vol. 54(2). – P. 179-187.
6. Skiba E.A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Sakovich, G.V. Yield and quality of bacterial cellulose from agricultural waste // *Cellulose*. – 2022. – Vol. 29(3). – P. 543-1555.

УДК 2788

ФАРМАКОКИНЕТИКА НОВОГО АНАЛЬГЕТИКА НА ОСНОВЕ 2Н-ХРОМЕНАН.В. Гуркин, В.В. Быков, И.В. Ильина

Научный руководитель: профессор, д.мед.н., А.И. Венгеровский

Сибирский государственный медицинский университет,

Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050

ООО «Инновационные фармакологические разработки»,

Россия, г. Томск, ул. Елизаровых, 79/4, 634021

Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН

Россия, г. Новосибирск, пр-кт Академика Лаврентьева, 9, 630090

E-mail: nvgurkin@yandex.ru**PHARMACOKINETICS OF A NEW ANALGESIC BASED ON 2H-CHROMENE**N.V Gurkin, V.V. Bykov, I.V. Il'ina

Scientific Supervisor: Prof., Dr. A.I. Vengerovskii

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovskii trakt, 2, str., 634050

Innovative Pharmacology Research LLC, Russia, Tomsk, Elizarovykh, 79/4, str., 634021

Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, SB RAS, Russia, Novosibirsk, Lavrentjev Av., 9, 630090

E-mail: nvgurkin@yandex.ru

Abstract. *Pharmacokinetics of the CHR compound in blood plasma and its content in the brain after single administration to mice was studied. It was demonstrated that the CHR compound at a dose of 5.0 mg/kg is absorbed from the gastrointestinal tract and penetrates into the brain in a relatively short period. It is assumed that the existing concentration of analgesic in the brain is insufficient for the development of psychotropic effects with normal function of the blood-brain barrier, which is confirmed by the results of the previously conducted "Open Field" test.*

Введение. Боль – многогранная и широко распространенная проблема современного здравоохранения. Лечение боли различной интенсивности предусматривает прием опиоидных и неопиоидных анальгетиков, нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) и препаратов адьювантной терапии [1]. Однако средства из этих групп нередко вызывают лекарственную зависимость, нарушают работу респираторной и мочеполовой систем, оказывают ulcerогенное действие. В связи с этим актуальна разработка нового анальгетика CHR, который в эксперименте проявляет выраженную анальгетическую активность и не обладает характерными для существующих обезболивающих средств побочными эффектами. Соединение CHR является агонистом каннабиноидных рецепторов CB₁, при этом не проявляет присущей данному классу соединений психотропной активности. В рамках доклинических исследований для каждого лекарственного средства является обязательным изучение фармакокинетики в плазме [2]. В рамках данной работы также было изучено проникновение анальгетика в головной мозг.

Цель настоящей работы – изучить фармакокинетику соединения CHR в плазме крови и головном мозге.

Экспериментальная часть. Исследование проводили на 35 белых мышах стока CD-1 массой тела 45 ± 2 г. Животных содержали в барьерном виварии в пластиковых клетках (по 5 особей) при температуре

18-26 °С, относительной влажности воздуха 45–65 %, воздухообмене 10-11 об/ч и регулируемом световом режиме (12 : 12 ч). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ООО «Ифар» № 135 от 02.06.2022.

Соединение CHR вводили мышам в желудок натошак (время голодания 16 ч) в эффективной дозе 5 мг/кг однократно в форме водного раствора, для повышения биодоступности добавляли амфифильный растворитель гелюцир. Кровь забирали до введения и через 0,5, 1, 4, 8, 24 и 48 ч после введения. Временные точки были выбраны на основании предыдущих пилотных исследований. Кровь стабилизировали гепарином, плазму получали центрифугированием при 1600 g в течение 15 мин. Головной мозг промывали от крови и гомогенизировали с этилацетатом. Плазму и гомогенат головного мозга замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70 °С до проведения анализа.

Концентрацию CHR в плазме и головном мозге определяли методом ВЭЖХ-УФ (хроматограф «Милюхром-02», Россия) с использованием валидированных методик. В рамках исследования были рассчитаны следующие фармакокинетические параметры:

C_{max} – максимальная концентрация CHR в плазме и органах;

T_{max} – время до достижения максимальной концентрации в плазме и органах;

AUC_{0-t} – площадь под кривой «концентрация CHR – время» в интервале от 0 до момента t отбора последнего образца крови, вычисленная линейным методом трапеций (формула 1):

$$AUC_{0-t} = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i + C_{i+1}) \quad (1)$$

MRT – среднее время удержания активного вещества в плазме (формула 2):

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC_{0-t}} \quad (2)$$

$T_{1/2}$ – период полуэлиминации активного вещества (формула 3):

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{el}} \quad (3)$$

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 8.0. Данные подчинялись нормальному закону распределения и представлены в виде среднего значения и ошибки среднего. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Концентрация CHR в плазме крови после однократного введения в желудок мышам достигает максимума (T_{max}) через $0,67 \pm 0,17$ ч и определяется в течение (MRT) $8,62 \pm 4,44$ ч. Пиковая концентрация CHR в головном мозге достигается через $0,50 \pm 0,00$ ч и удерживается в нем в течение $1,03 \pm 0,41$ ч. Значения максимальной концентрации (C_{max}) в плазме крови составляют 5786 ± 1460 нг/мл, в головном мозге – 127 ± 25 нг/мл. Системная экспозиция (AUC) соединения CHR в плазме крови составляет 15207 ± 3103 нг×ч/мл, в головном мозге – 123 ± 45 нг×ч/мл. Период полувыведения вещества из плазмы крови составляет $1,49 \pm 0,10$ ч, из головного мозга – $1,62 \pm 0,00$ ч (табл. 1).

Таблица 1

Усредненные фармакокинетические параметры CHR в плазме и головном мозге при однократном введении в желудок мышам в эффективной дозе 5 мг/кг

Фармакокинетический параметр	Плазма	Головной мозг
C_{max} , нг/мл *	5786 ± 1460	127 ± 25
T_{max} , ч	$0,67 \pm 0,17$	$0,50 \pm 0,00$
AUC_{0-t} , нг×ч/мл *	15207 ± 3103	123 ± 45
MRT, ч *	$8,62 \pm 4,44$	$1,03 \pm 0,41$
$T_{1/2}$, ч	$1,49 \pm 0,10$	$1,62 \pm 0,00$

* – значимые отличия показателей при введении CHR в дозе 5,0 мг/кг ($p < 0,05$).

После введения в желудок мышам соединение CHR в дозе 5,0 мг/кг за относительно короткий отрезок времени, менее 1 ч, всасывается из желудочно-кишечного тракта и проникает в головной мозг. За счет слабых кислотных свойств молекулы процесс абсорбции, вероятно, начинается в желудке. Соединение CHR проникает в головной мозг в количествах около 2 % от плазменных. Мы предполагаем, что существующей концентрации анальгетика в головном мозге недостаточно для развития психотропных эффектов при нормальной функции гематоэнцефалического барьера, что подтверждается результатами проведенного ранее теста «Открытое поле», в котором у животных, получавших CHR в эффективной дозе 5,0 мг/кг, поведение было сопоставимо с контрольными.

Число моль CHR в головном мозге мышей всего в 2 раза меньше количества моль Δ^9 -тетрагидроканнабинола, который оказывает выраженное психотропное действие [3]. Вероятно, CHR не обладает значимой психотропной активностью и кратное увеличение концентрации анальгетика в головном мозге не должно приводить к появлению значимых психотропных эффектов.

При введении в желудок соединение CHR определяется в крови мышей на протяжении 8 ч и имеет относительно невысокий период полувыведения (около 1 ч). При этом в ранее проведенном эксперименте анальгетическая активность CHR сохранялась на протяжении 24 ч после однократного введения в желудок мышам. Это может свидетельствовать о возможном депонировании анальгетика в тканях и его постепенном перераспределении в системный кровоток.

Заключение. Разрабатываемый анальгетик на основе 2H-хромена относительно быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта и оказывает длительное анальгетическое действие за счет долгого перераспределения из тканей. Анальгетик слабо проникает в головной мозг и не оказывает в эффективной дозе психотропной активности. Соединение CHR видится перспективным лекарственным средством для снятия острых и хронических болевых синдромов без риска развития побочных эффектов, присущих каннабиноидам, опиоидам и НПВС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рубрикатор клинических рекомендаций Минздрава России: официальный сайт. Хронический болевой синдром (ХБС) у взрослых пациентов, нуждающихся в паллиативной медицинской помощи. – Москва, 2023. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: – URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/400_2 (дата обращения: 25.03.2023)
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 1607 с.
3. Torrens A., Vozella V., Huff H. et al Comparative Pharmacokinetics of D9-Tetrahydrocannabinol in Adolescent and Adult Male Mices // J Pharmacol Exp Ther. – 2020. – Vol. 374., № 1. – P. 151-160.

УДК 1:618.19-006.6:575.853:575.117.2

**ВЛИЯНИЕ КОЛИЧЕСТВА АМПЛИФИКАЦИЙ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ НА УРОВЕНЬ
ИХ ЭКСПРЕССИИ И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ
И ОПУХОЛЕЙ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Д.С. Долгашева^{1,2}, И.А. Цыденова^{1,2}, Е.А. Кравцова^{1,2}

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Н.В. Литвяков^{1,2}

¹НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный 5, 634050

²Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: normikus.18.97@gmail.com

**INFLUENCE OF THE NUMBER OF STEM GENE AMPLIFICATIONS ON THEIR EXPRESSION
LEVEL AND SUBPOPULATION COMPOSITION OF CELL LINES AND TUMORS
IN BREAST CANCER PATIENTS**

D.S. Dolgasheva^{1,2}, I.A. Tsydenova^{1,2}, E.A. Kravtsova^{1,2}

Scientific Supervisor: Prof., Dr. N.V. Litvyakov^{1,2}

¹Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kooperativniy lane, 5, 634050

²Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina av., 36, 634050

E-mail: normikus.18.97@gmail.com

Abstract. *In the present study we studied the effect of the number of amplifications of stemness genes on the subpopulation composition of standard breast cancer cell lines as well as the dependence of the level of expression of stemness genes on the number of amplifications in cell lines and tumors of breast cancer patients. We used breast cancer cell lines BT549, MDA-MB-231, MCF7, T47D, and BT474. The expression of stemness genes in tumor pre-treatment and cell lines was assessed on CytoScan™ HD Array and Clariom™ S Assay microarrays; stemness gene amplifications were studied using CytoScan HD Array microarrays. The subpopulation composition of the studied lines was studied by flow cytometry with antibodies to CD44 and CD24. The number of amplifications of stemness genes was shown to affect the subpopulation composition of cell lines and the expression of stemness genes in cell lines and in the tumor of breast cancer patients. For example, the highest number of amplified stemness genes was found in the BT474 line and the highest expression of stemness genes was observed in this line. When studying the subpopulation composition of the lines, the frequency of more differentiated subpopulations and the degree of their differentiation in the series from stem CD44+CD24- to differentiated CD44-CD24- cells increased with increasing number of amplifications of stemness genes.*

Введение. Несмотря на то, что метастатическая болезнь является основной причиной смерти онкологических больных, она все же остаётся малоизученной. В связи с этим в последние годы появляется все больше работ, связанных с исследованием различных механизмов метастазирования, а в частности приобретения опухолевыми клетками способности к дедифференцировке за счет индукции

эктопической экспрессии генов стволовости. Так во многих работах было показано, что трансфекция или принудительная гиперэкспрессия генов стволовости повышает стволовость опухолевых клеток [1–5]. В 2020 году нами была опубликована статья, в которой была высказана обоснованная гипотеза о том, что метастазировать могут только опухоли, которые приобрели способность к дедифференцировке за счет эктопической экспрессии генов стволовости [6]. Мы показали, что приобретение клетками способности к дедифференцировке является маркером готовности опухоли к метастазированию.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния количества амплификаций генов стволовости на субпопуляционный состав стандартных клеточных линий рака молочной железы, а также зависимости уровня экспрессии генов стволовости от количества амплификаций в клеточных линиях и опухоли больных раком молочной железы.

Экспериментальная часть. В исследование было включено 39 больных раком молочной железы и клеточные линии рака молочной железы: BT549, MDA-MB-231, MCF7, T47D и BT474. Оценка экспрессии генов стволовости в опухоли до лечения и клеточных линиях проводилась на микрочипах CytoScan™ HD Array и Clariom™ S Assay, амплификации генов стволовости изучали при помощи микроматриц CytoScan HD Array. Субпопуляционный состав исследуемых линий изучали методом проточной цитометрии с антителами к CD44 и CD24.

Результаты. У пациентов в опухоли до лечения, согласно F-test статистически значимо, в зависимости от количества амплификаций генов стволовости изменялась экспрессия 18 генов стволовости. Корреляционный анализ уровня экспрессии генов стволовости с количеством амплификаций в опухоли показал статистически значимую положительную корреляцию с числом амплификаций для 9 генов (*FZD9*, *CDK6*, *PIM1*, *SOX8*, *TERT*, *CCNF*, *KLF5*, *TGFBR1*, *SOX4*) с R от 0.31-0.66, на уровне тенденции ($p < 0.1$) еще для *NOTCH1* и *TGFBI*. Минимальное значение коэффициента корреляции отмечается для гена *POU5F1* = 0,17. Для клеточных линий также отмечается повышение уровня экспрессии генов стволовости с увеличением числа амплифицированных генов. Наибольшее количество амплифицированных генов стволовости – 15 было обнаружено в линиях BT474 и MDA-MD-468, и в этих же линиях отмечалась наибольшая экспрессия генов стволовости. ПЦР-анализ подтвердил данные по повышению экспрессии при сравнении линий T47D (11 амплифицированных генов) и BT474 (15 амплифицированных генов) (Рис.1).

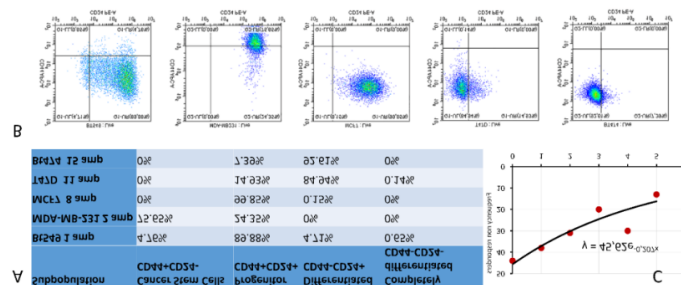


Рис. 1. Ассоциация субпопуляционного состава клеточных линий и частоты плохого ответа на NAC с количеством амплификаций генов стволовости. Примечание: А- субпопуляционный состав клеточных линий в зависимости от количества амплификаций генов стволовости, В – данные проточной цитометрии по субпопуляционному составу клеточных линий, С – частота плохого ответа на NAC у больных раком молочной железы в зависимости от количества амплификаций генов стволовости в опухоли до лечения. По оси абсцисс – количество амплификаций хромосомных регионов локализации генов стволовости

При изучении субпопуляционного состава линий отмечается, что с увеличением количества амплификаций генов стволовости увеличивается частота более дифференцированных субпопуляций и степень их дифференцировки в ряду от стволовых CD44+CD24- клеток к дифференцированным CD44-CD24-. Мы полагаем, что при большом количестве амплификаций, клетки легко дедифференцируются с образованием стволовых клеток. На рисунке 1С представлена зависимость частоты ответа на неоадьювантную химиотерапию у больных в зависимости от количества амплификаций локусов генов стволовости в опухоли до лечения. Видна обратная экспоненциальная зависимость $y = 45,62e^{-0,207x}$ от количества амплификаций. Чем больше количество амплификаций, тем меньше частота больных, которые не ответили на неоадьювантную химиотерапию.

Заключение. Таким образом было установлено, что количество амплификаций генов стволовости оказывает влияние на субпопуляционный состав клеточных линий и экспрессию генов стволовости в клеточных линиях и в опухоли больных раком молочной железы.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 21-15-00243)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gergely J.E., Dorsey A.E., Dimri G.P., Dimri M. Timosaponin A-III inhibits oncogenic phenotype via regulation of PcG protein BMI1 in breast cancer cells // *Molecular Carcinogenesis*. – 2018. – Vol. 57(7). – P. 831-41.
2. Gong W., Sun B., Sun H., Zhao X., Zhang D., Liu T., Zhao N., Gu Q., Dong X., Liu F. Nodal signaling activates the Smad2/3 pathway to regulate stem cell-like properties in breast cancer cells // *American journal of cancer research*. – 2017. – Vol. 7(3). – P. 503.
3. Murakami S., Ninomiya W., Sakamoto E., Shibata T., Akiyama H., Tashiro F. SRY and OCT4 Are Required for the Acquisition of Cancer Stem Cell-Like Properties and Are Potential Differentiation Therapy Targets // *Stem Cells*. – 2015.– Vol. 33(9). – P. 2652-63.
4. Song W.-S., Yang Y.-P., Huang C.-S., Lu K.-H., Liu W.-H., Wu W.-W., Lee Y.-Y., Lo W.-L., Lee S.-D., Chen Y.-W. Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells // *Journal of the Chinese Medical Association*.– 2016.– Vol. 79(10).– P. 538-45.
5. Tao L., Shu-Ling W., Jing-Bo H., Ying Z., Rong H., Xiang-Qun L., Wen-Jie C., Lin-Fu Z. MiR-451a attenuates doxorubicin resistance in lung cancer via suppressing epithelialmesenchymal transition (EMT) through targeting c-Myc // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2020. – Vol. 125. –P. 109962.
6. Litviakov N., Ibragimova M., Tsyganov M., Kazantseva P., Deryusheva I., Pevzner A., Doroshenko A., Garbukov E., Tarabanovskaya N., Slonimskaya E. Amplifications of stemness genes and the capacity of breast tumors for metastasis // *Oncotarget*. – 2020. – Vol. 11(21). – P.1988-2001.

УДК 616-097

**ВЛИЯНИЕ КСЕНОГЕННЫХ ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ В ФОРМИРОВАНИИ
ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА IN VIVO**А.Б. Доржиева

Научный руководитель: д.м.н. Г.В. Селедцова

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии,

Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14, 630099

E-mail: dorzhieva-ayana@yandex.ru**THE EFFECT OF XENOGENIC TESTICULAR ANTIGENS IN THE FORMATION OF ANTITUMOR
IMMUNITY IN VIVO**A.B. Dorzhieva

Scientific Supervisor: Dr. G.V. Seledtsova

Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Russia, Novosibirsk, Yadrinsevskaya str., 14, 630099

E-mail: dorzhieva-ayana@yandex.ru

Abstract. *The weak immunogenicity of tumor-associated antigens (TA) and the insufficiency of costimulating molecules on the surface of tumor cells is the reason that the immune system cannot recognize and destroy mutated cells. Since the biochemical processes of tumor cells and healthy tissue cells are identical, the creation of effective chemotherapeutic drugs is not limited by the selectivity of their action. This work shows the effect of testicular tumor-associated antigens of various origins for the formation of antitumor protection in mice and their comparison.*

Введение. Известно, что опухолевые клетки отличаются от нормальных клеток по количеству и качеству иммунологических маркеров (антигенов, АГ). Такими специфическими маркерами опухолей разного генеза являются АГ, которые в здоровом организме присутствуют в клетках яичка и тканях плода. Эти опухолеассоциированные АГ (ОАА) играют важную роль в поддержании высокой ростовой и инвазивной активности опухолевых клеток [1, 2]. Большинство ОАА представлено эволюционно консервативными молекулами, поэтому регистрируется высокая степень гомологии между ОАА человека и животных. В конечном счете, предполагается создание в организме человека активного иммунитета с помощью введения иммуногенных опухолевых антигенов, а введение ксеногенных ОАА могут быть более эффективными индукторами иммунных реакций для формирования усиленного противоопухолевого иммунитета [3, 4].

В специфической иммунотерапии онкологических заболеваний заинтересованы многие иммунологи и онкологи, так как у большинства пациентов, обратившихся за помощью, выявляются опухоли уже с поздними стадиями и степенями заболевания, а традиционные методы лечения на данный момент имеют множество побочных эффектов из-за своей неспецифичности и цитотоксичности. Поэтому проведение исследований по изучению эффективности использования различных видов профилактических противоопухолевых вакцин, является актуальной научной задачей, имеющей важное теоретическое и практическое значение.

Целью данной работы является характеристика параметров клеточного иммунитета у предварительно вакцинированных ксеногенной и сингенной тестикулярными вакцинами мышей-опухоленосителей и сравнение этих групп.

Экспериментальная часть. Эксперименты проводились в профилактическом варианте вакцинации. Мышей линии C57Bl/6 первоначально иммунизировали тестикулярными АГ 3х-кратно, 1 раз в неделю, полученным из тестикул барана (ксеногенная вакцинация) и сингенным тестикулярным АГ мыши (сингенная вакцинация). Через месяц после вакцинации мышам была привита опухолевые клетки карциномы легкого Льюиса LLC и клетки меланомы B16. Контрольная группа мышей ранее не была вакцинирована, ей были введены только опухолевые клетки.

Результаты. Мышей первоначально иммунизированных ксеногенным (по отношению к мышам) тестикулярным АГ (основная экспериментальная группа), сингенным тестикулярным АГ мыши (сингенный контроль) и контроль (интактные мыши без вакцинации АГ) оценивали по 50 % выживаемости после привития опухоли. Продолжительность жизни у контрольной группы составила 20 дней (50 % мышей), продолжительность жизни сингенной контрольной группы также составляла 20-25 дней. Мыши в экспериментальной группе прожили вдвое дольше, примерно 41-43 дня, и у 40 % из них опухоль регрессировала.

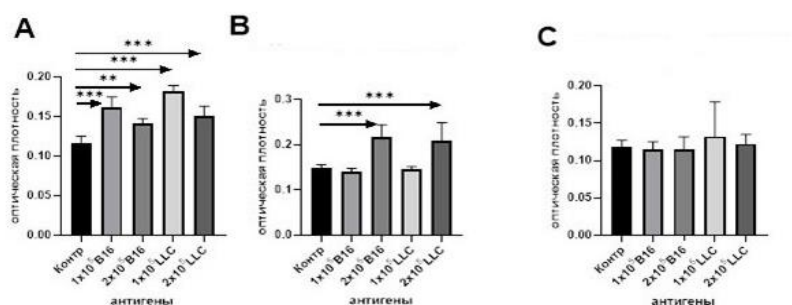


Рис. 1. Пролиферация спленоцитов, полученных от мышей-опухоленосителей LLC через 14 дней после введения опухолевых клеток. А – контроль без вакцинации, В – профилактическая вакцинация ксеногенными тестикулярными АГ, С – профилактическая вакцинация сингенными тестикулярными АГ

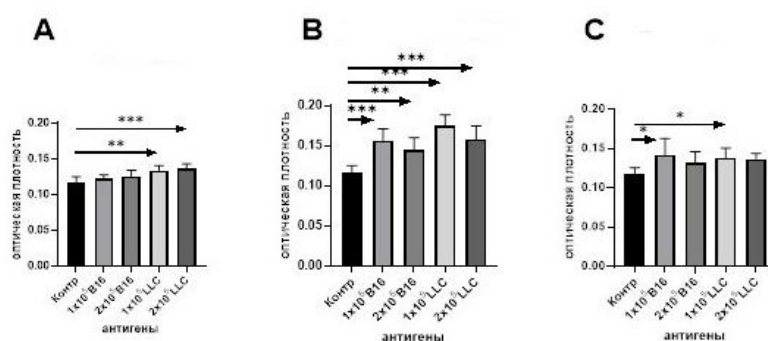


Рис. 2. Пролиферация спленоцитов, полученных от мышей-опухоленосителей B16 через 14 дней после введения опухолевых клеток. А – контроль без вакцинации, В – профилактическая вакцинация ксеногенными тестикулярными АГ, С – профилактическая вакцинация сингенными тестикулярными АГ

Для оценки клеточного иммунного ответа проводилась оценка пролиферативного ответа на АГ опухоли LLC и B16. К выделенным клеткам селезенки (спленоцитам) ксеногенной (основной) группы, сингенного контроля и интактного контроля добавлялись АГ опухолевых клеток в различных концентрациях и измерялся пролиферативный ответ.

Уровень пролиферации спленоцитов, полученных от мышей-опухоленосителей B16 в группе контроля был примерно на одном уровне с группой сингенного контроля, в то время как в ксеногенной основной группе пролиферативный ответ был значительно выше. В ксеногенной основной группе мышей-опухоленосителей LLC пролиферативный ответ был значительно выше, по сравнению с группой контроля и сингенным контролем. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об усиленном иммунном ответе именно на ксеногенные тестикулярные антигены, а иммунный ответ на сингенные тестикулярные антигены сравним с иммунным ответом в интактной контрольной группе.

При измерении продукции цитокинов IFN γ и IL-10 лимфоцитами мышей-опухоленосителей в 3х группах были получены следующие данные: повышение содержания IFN γ и снижение IL-10 группе ксеногенной тестикулярной вакцинации по сравнению с сингенным контролем и интактным контролем при привитии опухолевых клеток B16, а также повышение содержания IFN γ группе ксеногенной тестикулярной вакцинации по сравнению с сингенным контролем и интактным контролем и снижение IL-10 в ксеногенной группе по сравнению с контролем при привитии опухолевых клеток LLC.

Заключение. На основе полученных экспериментальных данных было показано, что применение вакцины с ксеногенными тестикулярными АГ формирует протективный противоопухолевый иммунитет у мышей-опухоленосителей. Как свидетельствуют результаты, представленные в настоящей работе, специфическая иммунотерапия с использованием ксеногенной тестикулярной вакцины стимулируют специфический противоопухолевый иммунитет, что сопровождается снижением уровня IL-10 в сыворотке крови, усилением некроза/апоптоза опухоли и увеличением средней продолжительности жизни мышей-опухоленосителей. Таким образом, ксеногенная вакцинация может служить эффективным профилактическим инструментом формирования противоопухолевого иммунитета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bode P.K., Thielken A., Brandt S., Barghorn A., Lohe B., Knuth A., Moch H. Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis // *Mod.* – 2014. – Vol. 27., № 6. – P. 899-905.
2. Khodadoust M.S., Alizadeh A.A. Tumor antigen discovery through translation of the cancer genome // *Immunol. Res.* – 2014. – Vol. 58., № 2-3. – P. 292-299.
3. Geldmacher A., Freier A., Losch F.O., Walden P. Therapeutic vaccination for cancer immunotherapy: antigen selection and clinical responses // *Hum. Vaccin.* – 2011. – Vol. 7., – P. 115-119.
4. Strioga M.M., Darinskas A., Pasukoniene V., Mlynska A., Ostapenko V., Schijns V. Xenogeneic therapeutic cancer vaccines as breakers of immune tolerance for clinical application: to use or not to use? // *Vaccine.* – 2014. – Vol. 32., № 32. – P. 4015-4024.

УДК 574/577

СОЗДАНИЕ КСЕНОГРАФТА ИЗ КЛЕТОК ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

З.Б. Жалгасбаева^{1,2}

Научный руководитель: к.б.н. У.А. Бокова²

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

²НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

E-mail: ri_zzhh@mail.ru

CREATING A XENOGRAFT FROM BREAST TUMOR CELLS

Z.B. Zhalgasbaeva^{1,2}

Scientific Supervisor: PhD. U.A. Bokova

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina av., 36, 634050

²Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kooperativniy lane, 5, 634009

E-mail: ri_zzhh@mail.ru

Abstract. *The use of xenografts is one of the main tools for studying the tumorigenicity and progression of malignant neoplasms, including breast cancer (BC). Immunocompetent animals and a large number of cells are required to create such models. Currently, there are many animal models, but the selection of a specific experimental model is not an easy task. Despite the fact that there is no ideal in vivo model that would accurately repeat the clinical features of human cancers, the creation and study of xenografts (heterografts) of human tumors is one of the most adequate methods for solving many urgent problems in modern experimental oncology.*

Введение. Для изучения рака молочной железы (РМЖ) было разработано множество моделей *in vivo*. Эти модели используются для исследования факторов, связанных со злокачественной трансформацией, инвазией и метастазированием, а также для изучения ответа на терапию. Одной из наиболее широко используемых моделей является ксенотрансплантат опухоли человека. [1]

Существует несколько способов имитации роста и метастазирования опухоли молочной железы в экспериментах по трансплантации опухолевых клеток на животных моделях. Ортотопическая или эктотопическая имплантация раковых клеток подкожно или в жировую прокладку молочной железы с образованием первичных опухолей и последующим метастазированием частично напоминает несколько стадий, связанных с малигнизацией рака молочной железы у больных.

Чтобы изучить рост и распространение опухолей, полученных из линий клеток РМЖ человека *in vivo*, эксперименты по трансплантации клеток проводятся на иммунодефицитных мышах. Опухолевые клетки можно вводить подкожно, внутривенно, внутрисердечно, ортотопически в жировую подушку молочной железы мыши. [2] Существует большое разнообразие моделей мышей, каждая из которых имеет сильные и слабые стороны. [3]

Экспериментальная часть. Объект исследования: Мыши линии Balb/c-nude, самки, возраст 8 недель (10 особей).

Материал исследования: Операционный материал опухолей молочной железы 10 пациенток, не получавших предоперационную химиотерапию, клиники НИИ онкологии.

Мышам подкожно в область спины вводилась суспензия опухолевых клеток первичной опухоли со средой DMEM и с матригелем по стандартному протоколу [4] в объеме 100 мкл. Кроме того, для сравнения активного действия матригеля на рост опухолевых клеток введение клеточной суспензии проводила как с использованием матригеля, так и без.

Результаты. В ходе исследований после инъекции суспензий клеток мышам в течении суток наблюдалась небольшая пальпируемая припухлость в результате застывания матригеля при температуре тела животного. При дальнейших наблюдениях ни одной опухоли не выросло.

После имплантации цельных фрагментов опухолевого материала спустя 2 недели у всех мышей наблюдалось разрастание имплантированных фрагментов опухолей, при резекции опухолей была отмечена васкуляризация. А также врастание опухоли в мышечный слой брюшной стенки.

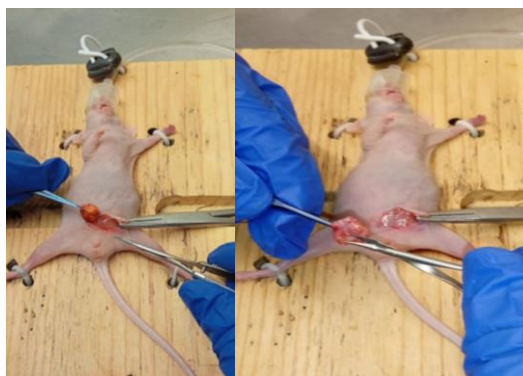


Рис. 1. Фрагмент опухоли

В течении нескольких недель наблюдалось увеличение размеров опухолей, индекс прироста в среднем составил 2,25, а также изменения формы в сторону шарообразной. Максимальный размер опухолей у мышей достигал более 410 мм³.

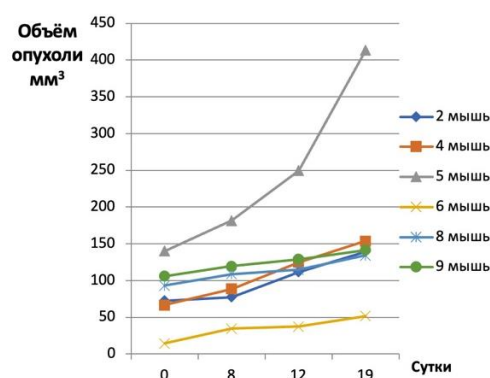


Рис. 2. Объем опухоли мм³

У пяти мышей наблюдались метастазы в регионарные лимфоузлы. А у одной мыши после резекции опухоли в течении недели возникло стремительное метастазирование. Выросла большая бластоидная неорганическая опухоль в забрюшинном пространстве, клетки которой соответствовали раку молочной железы человека.



Рис. 3. Метастатическая опухоль

Эвтаназия животных проводилась путём усыпления с CO₂ с последующим извлечением опухолей и некоторых органов (печени, лёгких, регионарных лимфоузлов) для морфологических и иммуногистохимических исследований. Также из полученной опухоли выделяли клетки для последующего мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа по определению фенотипа.

Заключение. В результате проведенных исследований были получены мышинные модели ксенографтов РМЖ. Максимальный размер опухоли у мыши № 5 составляет 412 мм³, а меньший размер опухоли (50 мм³) вырос у мыши № 6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Richmond A., Su Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics //Disease models & mechanisms. – 2008. – V. 1., №. 2-3. – P. 78-82.
2. Fantozzi A., Christofori G. Mouse models of breast cancer metastasis //Breast Cancer Research. – 2006. – V. 8., №. 4. – P. 1-11.
3. Holen I. et al. In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions //Disease models & mechanisms. – 2017. – V. 10., №. 4. – P. 359-371.
4. DeRose YS, Gligorich KM et al. Patient-derived models of human breast cancer: protocols for in vitro and in vivo applications in tumor biology and translational medicine // Curr Protoc Pharmacol. – 2013. – V. 14., 14.23. doi: 10.1002/0471141755.ph1423s60.

УДК 616.8-008.64

**ИССЛЕДОВАНИЕ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ
ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНЫХ СОСТОЯНИЙ**А.В. Журкина^{1,2}, П.Е. Никифоров¹

Научный руководитель: к.м.н. Ф.Е. Павловна

¹НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634028

²Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: mssova692@gmail.com**STUDY OF THE NERVOUS SYSTEM OF ANIMALS IN THE BACKGROUND
OF DEPRESSION-LIKE STATES**A.V. Zhurkina^{1,2}, P.E. Nikiforov¹

Scientific Supervisor: Ph.D., E.P. Fedorova

¹Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Russia, Tomsk, Lenin ave., 3, 634028²Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050E-mail: mssova692@gmail.com

Abstract. A single intraperitoneal application of *E.Coli* LPS at a dose of 250 µg/kg causes depression of the nervous system of experimental animals, accompanied by the development of a depressive-like state. During the experiment, a decrease in horizontal activity, mink reflex and total motor activity in the "open field" test was revealed. During the social test "resident-intruder", an increase in the total time of communication was noted, due to an increase in the time of the first communication, which may indicate a difficulty in the interaction of experimental animals with the "intruder".

Введение. Депрессия – тяжелое психическое заболевание, сопровождающееся подавленным состоянием и сниженной работоспособностью. В отличие от привычной любому человеку печали или грусти, депрессия вызывает длительное устойчивое подавленное состояние, которое сказывается на всех сферах жизни. Более того, большая доля всех самоубийств или попыток самоубийства приходится на людей, страдавших депрессией. Сегодня от депрессивных расстройств во всем мире страдают более 350 миллионов человек. В России процент заболевших составляет 5,5% (7 миллионов человек) [1]. Одной из проблем депрессии является высокая заболеваемость по всему миру. В лабораторных условиях тяжело воспроизвести весь спектр симптомов, которые испытывают пациенты при депрессии. Причиной тому является то, что у животных, участвующих в исследовании, нет саморефлексии, самоанализа, им недоступны такие понятия, как суицидальные мысли, подавленное состояние [2]. Соответственно в исследовании достаточно трудно оценить является ли полученное в ходе эксперимента состояние депрессией. В связи с вышесказанным актуальным является разработка модели депрессивно-подобного состояния на лабораторных животных.

Цель настоящей работы – оценка изменений в нервной системе лабораторных животных, при применении липополисахарида *E.Coli*, сопровождающихся депрессивно-подобным состоянием.

Экспериментальная часть. Исследование проведено на 10 мышах самцах линии CD-1 весом 21-25 г возрастом 2 месяца (питомник НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга, сертификат здоровья имеется). Для моделирования депрессивно-подобного состояния внутрибрюшинно вводили раствор липополисахарида (ЛПС) *E.Coli* (Sigma-Aldrich, США). Исследование проводилось в течении 48 часов. Были сформированы следующие группы: контроль, не подвергались воздействию ($n = 5$); ЛПС – ЛПС *E. coli* вводили однократно внутрибрюшинно в дозе 250 мкг/кг в объеме 0,01мл/г ($n = 5$) [3]. Для оценки нервной системы в исследовании использовали тесты «открытое поле» и «резидент-интродер». Исследования проводили через 24 часа после введения раствора ЛПС. Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое (X), ошибку среднего арифметического (m). Проверку на нормальность распределения проводили с помощью стандартизованных коэффициентов асимметрии и эксцесса. При несоответствии распределения нормальному закону использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Уровень значимости критериев задавали равным 1 % и 5 %.

Результаты. Исследование проводилось в рамках научной работы по поиску корректоров депрессивно-подобных состояний. При однократном введении в тесте «открытое поле» наблюдалось снижение горизонтальной активности на 53,4 % в сравнении с группой контроля (рис. 1). Также отмечалось понижение норкового рефлекса, на 41,3 % относительно контрольных величин. Эти изменения сказались на суммарной двигательной активности, которая была ниже соответствующего значения на 46,9 % в группе контроля.

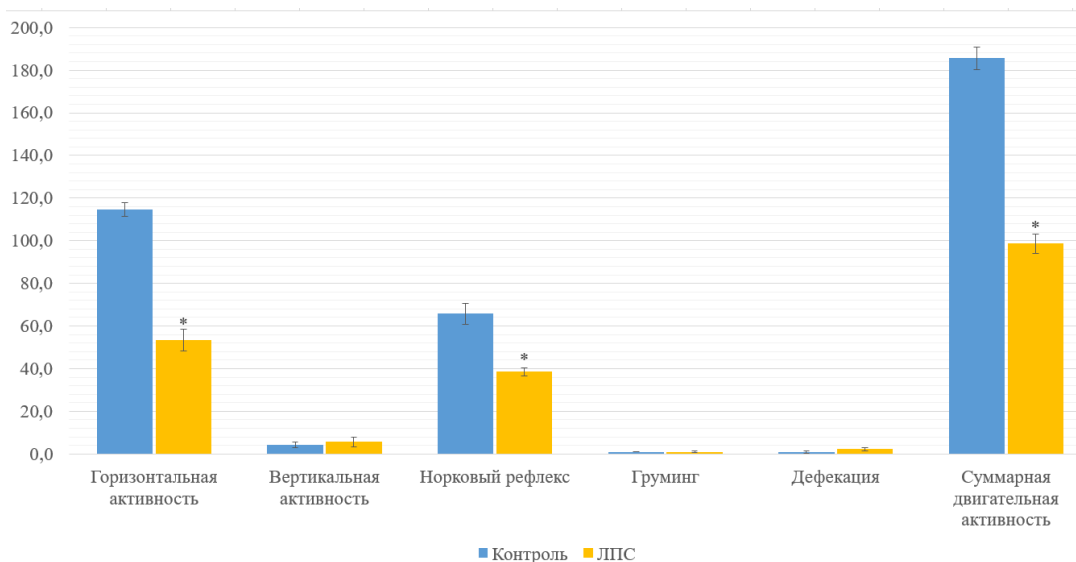


Рис. 1. Влияние внутрибрюшинного введения ЛПС *E.Coli* на показатели теста «Открытое поле»

Примечание. Здесь и далее * - $p < 0,05$ при сравнении экспериментальных групп с группой контроля.

При однократном введении ЛПС в тесте «резидент-интродер» наблюдалось повышение суммарного времени общения на 26,7 % относительно контрольных величин за счет увеличения продолжительности времени первого общения (рис. 2). Так, время первого общения превышало соответствующий показатель в контрольной группе на 228 %.

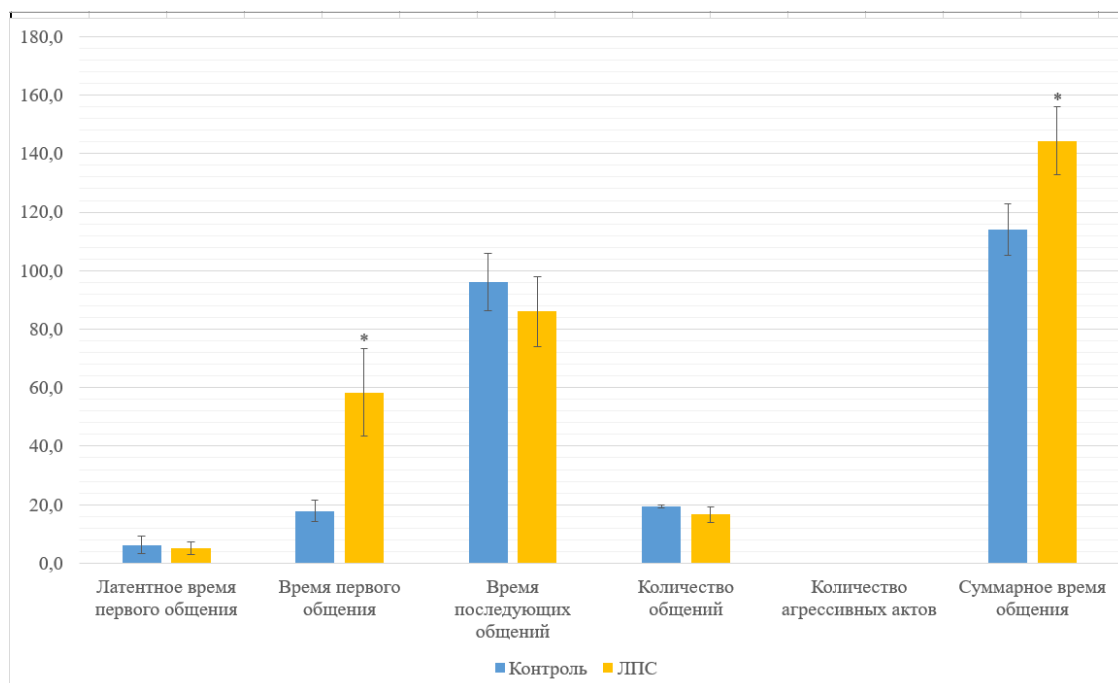


Рис. 2. Влияние внутрибрюшинного введения ЛПС *E. coli* на показатели теста «Резидент-интродер»

Заключение. Таким образом, однократное внутрибрюшинное введение ЛПС *E. coli* в дозе 250 мкг/кг приводит к угнетению нервной системы аутобредных мышей. Это выражается в снижении горизонтальной активности, норкового рефлекса и суммарной двигательной активности в тесте «открытое поле». Тогда как тест «резидент-интродер» показывает, что контрольные животные более заинтересованы в «интродере», но их общение более короткое, в отличие от экспериментальных животных, которые показывают противоположные результаты. Так, однократное введение большой дозы ЛПС вызывало повышение суммарного времени общения, за счет увеличения времени первого общения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Юрасова Е. Ю. Распространенность депрессии в странах мира // ББК 1 Р76. – 2018. – Т. 54815739. – №. 4. – С. 31.
2. Гарибова Т. Л., Крайнева В.А., Воронина Т.А. Поведенческие экспериментальные модели депрессии // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2017. – №3. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/povedencheskie-eksperimentalnye-modeli-depressii> (дата обращения: 25.02.2023).
3. Al-Shaimaa A. Elgarf, Sawsan Aboul-Fotouh, Hadwa A. Abd-Alkhalek, Mohamed El Tabbal, Ahmed N. Hassan, Samar K. Kassim, Gehad A. Hammouda, Kawthar A. Farrag, Ahmed M. Abdel-Tawab Lipopolysaccharide repeated challenge followed by chronic mild stress protocol introduces a combined model of depression in rats: Reversibility by imipramine and pentoxifylline. // Pharmacology, Biochemistry and Behavior journal. – 2014. – V. 1. – P. 152-162.

УДК 576.53

**СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ЯИЧНИКОВ**

А.Д. Казакова¹, А.Ю. Калинин², И.В. Ларионова^{1,2}

Научный руководитель: к.м.н., И.В. Ларионова

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г. Томск, пр. Ленина 36, 634050

²НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный 5, 634009

E-mail: a.kazakova99@mail.ru

**SUBPOPULATION COMPOSITION OF PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH
OVARIAN CANCER**

A.D. Kazakova¹, A.Y. Kalinchuk², I.V. Larionova^{1,2}

Scientific Supervisor: PhD., I.V. Larionova

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

²Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kooperativniy lane, 5, 634009

E-mail: a.kazakova99@mail.ru

Abstract. *Monocytes are the precursors of essential cells that control tumor progression, such as tumor-associated macrophages (TAMs), dendritic cells (DCs) and myeloid-derive suppressor cells (MDSC). Anti-tumor therapy can affect phenotype of circulating monocytes and therefore the phenotype of TAMs. Monocytes is a major source of TAMs, and are recruited to tumor mass from the blood circulation [1]. However, the mechanisms of monocyte programming in circulation by different therapeutic onsets are only emerging.*

Введение. Моноциты являются третьей по численности популяцией иммунных клеток в периферической крови после нейтрофилов и лимфоцитов, составляя ~ 4–11 % лейкоцитов в кровотоке у людей и 1–5 % у мышей [2]. Циркулирующие моноциты являются основными предшественниками опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ), которые в свою очередь выполняют широкий спектр функций в опухолевом микроокружении. Находясь в кровотоке, моноциты программируются циркулирующими опухолевыми факторами, а также противоопухолевыми препаратами, что может приводить к изменению их субпопуляционного состава и функций [2]. Профиль моноцитов, рекрутированных в ткани, связан с профилем дифференцирующихся из них ОАМ, а соответственно и с эффективностью противоопухолевого иммунитета, уровнем ангиогенеза и скоростью пролиферации опухоли [1]. В связи с чем, изучение профиля циркулирующих моноцитов важно для выявления новых прогностических маркеров, с целью предсказать эффективность химиотерапевтического лечения.

Экспериментальная часть. В исследование было включено 9 пациенток с диагнозом низкодифференцированная серозная карцинома яичников и 18 здоровых доноров в качестве группы контроля. Утром натощак до проведения какого-либо исследования была взята венозная кровь в вакуумные системы сбора крови, стабилизированные КЗ-ЭДТА. На первом этапе кровь обогащали на

градиенте плотности фиколла $1,077 \text{ г/см}^3$. Далее, клетки ресуспендировали в 150 мкл буфера для окрашивания (Cell Staining Buffer, Sony, Япония), к клеточной суспензии добавляли 5 мкл Human TruStain FcX™ (Biolegend, США), для блокирования неспецифического связывания, инкубировали в течение 10 минут. Затем окрашивали набором меченных моноклональных антител против маркеров лейкоцитов CD45, моноцитов CD14 и CD16, M2 субпопуляции макрофагов CD163 и CD206, рекрутинга моноцитов CCR2 и проангиогенной активности Tie2. Образцы инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре. Затем в каждую неокрашенную, окрашенную и контрольную пробу добавляли 1 мл буфера VersaLyse Lysing Solution для лизиса эритроцитов (Beckman Coulter, США). Далее образцы анализировали на проточном цитофлуориметре NovoCyte (ACEA Bioscience, США). Статистическая обработка результатов проводилась в программе Statistica 8.

Результаты. Оценка субпопуляционной структуры общего пула моноцитов у пациентов с раком яичников проводилась по трем основным субпопуляциям: классические CD14+CD16-, промежуточные CD14+CD16+ и минорные CD14-CD16+. Распределение моноцитарных субпопуляций составило 80-90 % для классических моноцитов, до 3,5 % моноцитов промежуточной субпопуляции и до 10 % минорной субпопуляции (Рис. 1).



Рис. 1. Индивидуальные профили субпопуляционного состава моноцитов в периферической крови пациенток с раком яичников

Результаты проточной цитометрии показали, что маркеры M2 поляризации CD163 и CD206 экспрессируется практически на моноцитах в каждой субпопуляции у 7 из 9 пациенток. CCR2 экспрессировался на более чем 80 % моноцитов классической CD14+CD16- популяции, в среднем на 60 % промежуточной CD14+CD16+ субпопуляции (экспрессия отсутствовала у 2 пациентов) и на 10-40 % минорной CD14-CD16+ субпопуляции (экспрессия отсутствовала у 1 пациента). Tie2 высоко экспрессировался на моноцитах классической и промежуточной субпопуляций, но у некоторых пациенток отсутствовала экспрессия Tie2 (Рис. 1).

Различия в субпопуляционном составе моноцитов оказались статистически значимыми. Наблюдались различия в общем содержании моноцитов в крови: 8,7 %, у пациентов и 11,8 % у доноров ($p=0,052$). Статистически значимые отличия были показаны для CD163+ субпопуляции макрофагов: CD14+CD16-CD163+ у пациентов 99,78 % и у доноров 93,92 % ($p<0,001$); CD14-CD16+CD163+ у пациентов 99,5 %, у доноров 93,8 % ($p<0,001$); CD14+CD16+CD163+ у пациентов 99,6 %, у доноров 62,2 % ($p<0,001$). Значимые различия показаны для промежуточной CD14+CD16+ субпопуляции макрофагов, экспрессирующих CD206 (пациенты – 91,4 %, доноры – 90,8 %) ($p=0,078$); CCR2 (пациенты – 68,60 %, доноры – 30,85 %) ($p<0,001$); Tie2 (пациенты – 99,92 %, доноры – 99,13 %) ($p<0,01$). Кроме того, повышение в содержании CD14+CD16-CCR2+ субпопуляции было показано для пациентов (89,72 %) по сравнению с донорами (53,54 % ($p=0,045$)). (Рисунок 2).

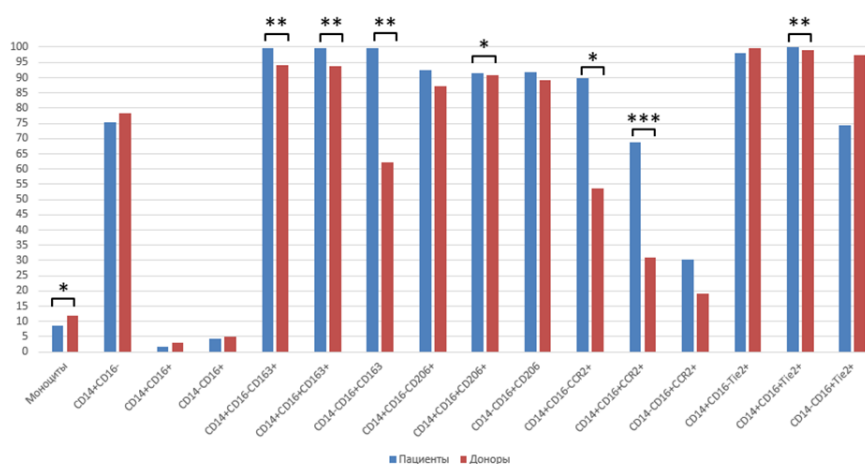


Рис. 2. Сравнение субпопуляционного состава моноцитов периферической крови пациенток с раком яичников и здоровых доноров

Примечание: * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$, *** – $p<0,001$

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что циркулирующие моноциты при раке яичников по сравнению с моноцитами доноров экспрессируют повышенный уровень маркеров про-опухолевой поляризации CD163 и CD206, а также хемотаксического фактора CCR2.

Работа выполнена при поддержке проекта РФФ №21-75-10021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Patysheva M. Monocyte programming by cancer therapy // Front Immunol. – 2022. – Vol. 13. – № 994319.
2. Kiss M. Systemic Reprogramming of Monocytes in Cancer // Front Oncol. – 2020. – Vol. 10. – № 1399.

УДК 612.111.4

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ БИОКОМПОЗИЦИОННЫХ
МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА**Н.К. Канашева, А.А. Губанков, Д.А. Федоришин

Научный руководитель: профессор, д.х.н. А.А., Бакибаев

Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: strix187@yandex.ru**STUDY OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NEW BIOCOSMPOSITE MATERIALS BASED
ON HYDROXYAPATITE**N.K. Kanasheva, A.A. Gubankov, D.A. Fedorishin

Scientific Supervisor: Prof., Dr., A.A. Bakibaev

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: strix187@yandex.ru

Abstract. Composites based on hydroxyapatite are promising materials for bone implants. One of the important properties of such biomaterials is the ability to inhibit the activity of microorganisms entering the wound during surgery. The aim of the study was to evaluate the antibacterial activity of hydroxyapatite scaffolds modified with different substances. Antimicrobial activity was studied for inhibition of *E. coli* growth. As a result, it was found that all samples suppressed the growth of *Escherichia coli*. It can be concluded that all samples have a pronounced antimicrobial activity.

Введение. В настоящее время одним из самых актуальных направлений исследований является разработка и изучение биосовместимых материалов, которые можно использовать для создания костных имплантатов. Эти материалы представляют собой биоконпозиты с различным химическим составом и структурой. Важным преимуществом таких материалов перед классическими материалами для искусственных костных имплантатов является их биохимическая совместимость, что означает более низкую интенсивность воспалительных реакций в тканях, окружающих имплантат [1].

Сейчас находятся в разработке новые биосовместимые композитные материалы на основе модифицированного гидроксиапатита, который обладает всеми свойствами, необходимыми для применения его в качестве минерального компонента биоконпозитов. Среди наиболее значимых из этих свойств можно выделить близкие к прочности кости механические характеристики, способность к биодеградации и низкую провоспалительную активность [1].

Гидроксиапатиты являются основными неорганическими компонентами костной ткани, которые можно использовать в качестве компонентов для биоконпозитов и покрытий для хирургических имплантатов. Эти материалы инертны к живым тканям и малотоксичны. При их применении вероятность аллергических реакций, воспалений и мутагенного действия довольно низка. Кроме того, модифицированные гидроксиапатиты могут ускорять процесс репаративного остеогенеза в месте имплантации и усиливать пролиферацию остеобластов [1].

Изучение антимикробных свойств гидроксиапатита - важное направление исследований, поскольку этот материал способен уничтожать бактерии, которые могут попасть в рану во время хирургической операции при проведении остеосинтеза. Параимплантарные и внутрибольничные инфекции, вызванные этими бактериями, могут серьезно повлиять на качество жизни пациента и требуют повторных операций, которые могут привести к осложнениям и инвалидизации. Поэтому разработка биосовместимых материалов с антимикробными свойствами имеет большое значение для совершенствования хирургической практики и улучшения результатов лечения пациентов.

Однако гидроксиапатит сам по себе не обладает достаточными антибактериальными свойствами. Поэтому для повышения антибактериальной активности на данный момент создается множество композиционных материалов, представляющих собой гидроксиапатит, импрегнированный различными соединениями [1].

На данный момент существует множество биологически активных веществ различного происхождения, как синтетического, так и природного, пригодных для этих целей. Одним из таких веществ являются производные природного пентациклического тритерпеноида бетулина, выделяемого из коры березы. Бетулин и его производные обладают высокой биологической активностью - проявляют комплекс биологически активных свойств, таких как ранозаживляющие, антибактериальные, противоопухолевые, гиполипидемические, гепатопротекторные, противовирусные и другие [2].

Еще одним веществом, пригодным для этого, является тетраметилолгликолурил (ТМГУ), так же имеющий антибактериальное действие. ТМГУ также нашел применение в медицине в качестве компонента бесформальдегидного фиксатора биоматериала для повышения качества фиксации, что помогает сохранять структуру тканей и клеток. В связи с этим данные вещества были выбраны для модификации гидроксиапатитных скаффолдов [3].

Целью исследования является оценка антибактериальной активности гидроксиапатитных скаффолдов, модифицированных различными веществами.

Экспериментальная часть. В данном исследовании использовались образцы, представляющие собой прессованные скаффолды из гидроксиапатита (ГА), имеющие форму цилиндра диаметром 20 мм и высотой 2 мм. Образцы представлял собой прессованные таблетки из гидроксиапатита с нанесенными методом окунания веществами – тетраметилолгликолурилом (ТМГУ, n = 6) и бетулином (БЕТ, n = 6) в различных сочетаниях. В качестве положительного контроля использовались аналогичные образцы с левомецетином (ЛЕВ, n = 6), нанесенным аналогичным методом. В качестве отрицательного контроля использовались аналогичные образцы без обработки. Для изучения влияния образцов на грамположительную и грамотрицательную микрофлору в качестве тест-объектов использован штамм *Escherichia coli* ATCC 25922. Определение антибактериальной активности осуществлялось стандартным диско-диффузионным методом в авторской модификации. Среды для культивирования тест-объектов готовились согласно рекомендациям производителя. На каждую чашку Петри с 15 мл соответствующей плотной питательной среды осуществлялся посев штамма *E. coli* методом газона из чистой культуры, после чего в центр чашки помещался образец. После инкубации измерялась зона подавления роста бактерий с точностью до 0,1 мм. Чем больше зона ингибирования роста бактерий, тем выше антибактериальная активность образца. Зоной ингибиции роста бактерий считалась зона полного подавления роста колоний.

Результаты. Образцы гидроксиапатита в сочетании с ТМГУ (ГА+ТМГУ) показали антибактериальную активность в отношении кишечной палочки. Зоны подавления роста *Escherichia coli* в этом случае в среднем составляли $28,1 \pm 1,0$ мм. В случае дополнительного нанесения бетулина (ГА+ТМГУ+БЕТ) зоны подавления роста тест-объекта составляли $27,0 \pm 1,0$ мм. Статистически достоверных различий между ними выявлено не было ($p > 0,05$). Образцы гидроксиапатита с хлорамфениколом и бетулином (ГА+ЛЕВ+БЕТ) показали самый высокий уровень антибактериальной активности среди всех представленных на исследования образцов, однако не было выявлено статистически достоверных различий между ними и положительным контролем ($p > 0,05$). Зоны подавления роста тест-объекта в этих случаях составляли $51,9 \pm 0,5$ и $50,9 \pm 1,1$ мм соответственно. Образец гидроксиапатита без обработки активности не проявил.

Заключение. Установлено, что все представленные на исследование образцы проявили антибактериальную активность, подавляя рост тест-объекта. ТМГУ и хлорамфеникол представляют собой достаточно токсичные соединения, могущие вызывать нежелательные реакции организма. Хотя прямого усиления антибактериального действия использованных в исследовании соединений выявлено не было, согласно литературным данным, использование бетулина в сочетании с антибактериальными средствами может ускорить процесс заживления и снизить риск осложнений.

Можно предположить, что бетулин усиливает начало воспалительной фазы заживления ран за счет временной активации провоспалительных медиаторов, что не приводит к длительному воспалению и хронизации раны. Более того, экстракт бересты влияет на вторую стадию заживления ран – фазу формирования новой ткани. При этом увеличивается миграция клеток в место повреждения. Миграция сильно зависит от морфологической поляризации клеток и происходит путем образования выступов мембраны на переднем крае клетки с формированием новых прикреплений к субстрату, сокращением тела клетки и, наконец, освобождением задней части клетки от субстрата [2]. Можно предположить, что основным механизмом ранозаживляющего действия бетулина является не ускорение пролиферации, а усиление миграции клеток в место повреждения, увеличение их выживаемости и активизация синтеза коллагена [2]. Миграция клеток *in vitro* исследуется путем тестов на царапины в конфлюэнтном монослое. Это станет следующей ступенью исследований.

Исследование выполнено при поддержке Программы развития Томского государственного университета (Приоритет-2030).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шпиняк С.П. Экспериментальное исследование антимикробной активности гидроксиапатита и наночастиц металлов *in vitro* // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6. – С. 75-84.
2. Scheffler A. The Wound Healing Properties of Betulin from Birch Bark from Bench to Bedside // *Planta Medica*. – 2019. – Vol. 85., № 7. – P. 524-527.
3. Пат. РФ. Ru 2752505 С1. Бесформальдегидный фиксатор биоматериала для гистологических и иммуногистохимических исследований / Д.В. Новиков, А.С. Князев, И.Н. Мазов, А.М. Водянкина. Заявлено 12.11.2020; Опубликовано 28.07.2021. Бюл. № 22. – 9 с.

УДК 616.995.122

**РАЗЛИЧИЯ В ДИНАМИКЕ СИСТЕМНОЙ ПАТОЛОГИИ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ТРЕМЯ ВИДАМИ
ОПИСТОРХИД (*O. FELINEUS*, *O. VIVERRINI* И *C. SINENSIS*) НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
МОДЕЛИ *M. AURATUS***

Я.К. Капушчак, О.Г. Запарина

Научный руководитель: д.б.н., М.Ю. Пахарукова

Институт Цитологии и Генетики СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, 630090

E-mail: YarikKaps@yandex.ru

**DIFFERENCES IN SYSTEMIC PATHOLOGY IN THREE OPISTHORCHIIDAE SPECIES
INFECTION (*O. FELINEUS*, *O. VIVERRINI* И *C. SINENSIS*) ON *M. AURATUS* ANIMAL MODEL**

Y.K. Kapushchak, O.G. Zaparina

Scientific Supervisor: Dr., M.Y. Pakharukova

Institute of Cytology & Genetics SB RAS, Russia, Novosibirsk, Lavrentiev ave., 10, 630090

E-mail: YarikKaps@yandex.ru

Abstract. *In present comparative study we have investigated the ability of three species of epidemiologically important Opisthorchiidae food-borne trematodes (*O. felineus*, *O. viverrini* and *Clonorchis sinensis*) affect the kidneys and glucose metabolism on animal model. Syrian hamsters *Mesocricetus auratus* were infected with metacercariae of one of three species of liver flukes. One, two and three months after the infection we assessed the serum biochemical parameters and structural abnormalities in hamster kidneys and liver.*

Введение. Описторхоз – это широко распространенное заболевание, которое характеризуется паразитированием печеночного сосальщика в гепатобилиарной системе рыбообразных млекопитающих, включая человека. Заражение происходит при употреблении в пищу рыбы семейства карповых. Выделяют три основных вида, паразитических трематод, которые относятся к семейству Opisthorchiidae – *Opisthorchis felineus* (OF), *Opisthorchis viverrini* (OV) и *Clonorchis sinensis* (CS). Заболевание, вызываемое этими трематодами, имеет множество общих черт патогенеза. Все три паразита приводят к развитию хронического воспаления печени, которое характеризуется перидуктальной инфильтрацией и фиброзом, пролиферацией желчных протоков с последующим развитием холангиофиброза и изменениям эпителия желчных протоков, включая гиперплазию, метаплазию, дисплазию с последующим развитием холангиокарциномой [1]. Однако существуют отличия между указанными паразитами. Во – первых ареалы указанных трематод практически не пересекаются. OF широко распространен на территории Российской Федерации особенно в бассейне рек Обь и Иртыш. OV и CS распространены на территории Дальнего Востока. OV преимущественно встречается на территории Таиланда, а CS – на территории Кореи и Китая. Во – вторых, вероятность развития холангиокарциномы сильно отличается в зависимости от вида. OV и CS признаны канцерогенами первого порядка для человека, в то время как OF, по-видимому, обладает более низким канцерогенным потенциалом. Также важно отметить способность описторхоза оказывать воздействие за пределами очага заболевания, что, в целом, характерно для многих паразитарных

инфекций. Это подтверждается как клиническими исследованиями [2], так и описано на экспериментальных моделях [3]. В связи с этим, в рамках данной работы были поставлены две глобальные задачи: 1) оценить вероятность и ключевые элементы системного воздействия описторхид в динамике инфекции на экспериментальной модели и 2) провести сравнительный анализ воздействия трех видов описторхид в рамках одного исследования.

Экспериментальная часть. Метацеркарии трематод были привезены из эндемичных регионов (OV из Таиланда, CS из Китая, OF из Новосибирска) и доставлены в нашу лабораторию для проведения эксперимента. Золотистые хомячки *Mesocricetus auratus*, возрастом 2 месяца разделили на три группы по 15 животных в каждой и заражали перорально 75-метацеркариями одного из видов трематод (*O. felineus*, *O. viverrini* или *Clonorchis sinensis*.) Забор материала осуществлялся через 1, 2 и 3 месяца после заражения (на каждом сроке было по 5 животных зараженным одним из указанных видов трематод). Для каждой экспериментальной группы *M. auratus* была контрольная группа неинфицированных животных соответствующего возраста по 9 животных в каждой. Поскольку достоверных отличий между контрольными животными разных сроков установлено не было, все данные были объединены в одну группу. Была проведена оценка патоморфологических изменений печени и почек, которая осуществлялась с помощью количественного морфометрического анализа. Гистологические срезы были окрашены гематоксилин-эозином, по Маллори и после импрегнации серебром. Также проводился иммуногистохимический анализ на парафиновых и замороженных срезах почек. Биохимический анализ проводили с использованием стандартных наборов. Статистический анализ данных был проведен с помощью R.

Результаты. Для оценки выраженности печеночной патологии при заражении разными видами описторхид был проведен количественный морфометрический анализ срезов печени, окрашенных гематоксилин-эозином. Для оценки были выбраны следующие параметры: воспалительная инфильтрация, перидуктальный фиброз, холангиофиброз, пролиферация желчных протоков, гиперплазия и дисплазия эпителия желчных протоков. Изменения наблюдались с первого месяца инфекции, однако наиболее выраженными они становились к третьему. На этом сроке при заражении каждым из трех видов описторхид были обнаружены отличия от контрольной группы ($P \leq 0.05$) по каждому из вышеперечисленных параметров. Также были обнаружены отличия между группами, зараженными разными видами паразитических трематод. Так, уровень перидуктального фиброза в группе OF был в 1,43 раза ($P = 0,017$) выше, чем при заражении OV. Уровень пролиферации желчных протоков при заражении OV был наиболее низким и отличался от OF в 2,55 ($P = 0,006$) раза и CS в 2,91 раза ($P = 0,006$). Гиперплазия холангиоцитов, наоборот, была наиболее выражена при заражении OV и превышала значения OF и CS в 1,76 ($P = 0,031$) и 2,5 ($P = 0,004$) раза соответственно. Разницы между группами по уровню дисплазии эпителия и воспалительной инфильтрации на третьем месяце выявлено не было.

Среднее значение уровня креатинина в моче превышало контрольное значение (89.14 ± 18.90) на первом месяце исследования при заражении OF (385.71 ± 176.55) и CS (466.20 ± 221.48) в 4,32 ($P = 0.014$) раза и 5,23 ($P = 0.008$) раза соответственно. На втором месяце эксперимента уровень креатинина в моче снизился, однако, несмотря на это, превышал контрольное значение (68.57 ± 23.08) в 3,42 ($P = 0.049$) раза при заражении OF и в 2,16 ($P = 0.019$) раза при заражении CS. На третьем месяце уровень креатинина в моче стабилизировался и не превышал контрольные значения ни у одной из групп. Уровень креатинина в моче при заражении OV не отличался от контроля на всех трех месяцах

эксперимента. Уровень креатинина в сыворотке крови превышал контрольное значение при заражении OF и OV в 2,67 ($P = 0.029$) раза и 2,58 ($P = 0.017$) раза соответственно, а также уровень креатинина в группе, зараженной CS в 1,74 ($P = 0.016$) раза и 1,69 ($P = 0.011$) раза соответственно. На втором месяце только при заражении OF было обнаружено повышение уровня креатинина в сыворотке кров в 2,90 ($P = 0.003$) раза. На третьем месяце креатинин в сыворотке крови превышал значение неинфицированной группы при заражении всеми тремя видами (OF в 1,81 ($P = 0.003$) раза, OV в 1,73 ($P = 0.044$) раза и CS в 1,56 ($P = 0.025$) раза), однако отличий между инфицированными группами обнаружено не было. При анализе уровня глюкозы в сыворотке крови, было обнаружено увеличение этого метаболита на первом месяце при заражении OV относительно OF и CS групп в 1,78 ($P = 0.016$) раза и 1,70 (0.032) раза соответственно. Однако в динамике инфекции уровень глюкозы при заражении OF значительно ($T = 6.847$, $P \ll 0.001$) повышался и на втором месяце превышал значения контрольной, OV и CS групп в 1,82 ($P = 0.003$) раза, 1,83 ($P = 0.0016$) раза и 1,92 ($P = 0.008$) раза соответственно. На третьем месяце уровень глюкозы оставался повышенным также только у животных, зараженных OF и превышал значения контрольной, OV и CS групп в 2,10 ($P = 0.001$) раза, 1,67 ($P = 0.001$) раза и 2,52 ($P = 0.003$) раза соответственно. Окрашивание трихромом по Маллори позволило нам выявить интерстициальный фиброз в корковом слое почки при заражении преимущественно только OF. Таким образом уровень интерстициального фиброза у OF группы превышал значение контрольной и OV групп в 51 раз ($P = 0.0084$) и в 10 раз ($P = 0.0206$) соответственно.

Заключение. В результате проведенных исследований нам удалось продемонстрировать отличия при развитии печеночной патологии при экспериментальном заражении золотистых хомячков *M. auratus* тремя видами паразитических трематод (*O. felinus*, *O. viverrini* и *Clonorchis sinensis*). Также было показана способность этих паразитов оказывать влияние на почки, орган, который лежит за пределами очага инфекции и никак не связан с путями миграции описторхид в организме хозяина. Выраженность почечной патологии также отличалась при заражении разными видами паразитов и была наиболее характерна при инфекции, вызванной OF. Отдельного внимания заслуживает способность описторхид оказывать влияние на метаболизм глюкозы организма-хозяина, которая также наиболее выражена у OF и имеет положительную динамику на протяжении первых трех месяцев инфекции.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда и правительства Новосибирской области (№22-25-20018).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pakharukova M.Y., Mordvinov V.A. The liver fluke *Opisthorchis felinus*: biology, epidemiology and carcinogenic potential // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2016 – Vol. 110 (1). – P. 28-36.
2. Kolosovskaya T.A., Khardikova S.A., Kalyuzhina Ye.V., Surkova L.G., Zamyshevskaya K.A., Varlacheva K.A. Chronic kidney disease in patients with psoriasis, chronic opisthorchiasis and at their combination // Bull. Siberian Med.– 2009 – Vol. 4. – P. 129-133.
3. Kapushchak, Y.K., Zaporina, O.G., Mordvinov, V.A., Pakharukova, M.Y. Time-dependent renal pathologies associated with the liver fluke infection, opisthorchiasis felinea // Acta tropica. – 2022 – Vol. 228. – P. 106282.

УДК 615.212.7

**АНТИНОЦИЦЕПТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ КЛАССА
ГЕКСААЗАИЗОВЮРЦИТАНОВ**Е.А. Киселева¹, О.В. Байбакова²Научный руководитель: д.б.н. С.Г. Крылова¹¹НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга,
Россия, Томск, пр. Ленина, 3, 634028²Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН
Россия, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1, 659322E-mail: Kiseleva_ea@pharmso.ru**ANTINOCICEPTIVE EFFECTS OF NEW COMPOUNDS FROM THE CLASS
OF HEXAAZAISOWURZITANES**Е.А. Kiseleva¹, O. V. Baibakova²Scientific Supervisor: PhD., S.G. Krylova¹¹Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Russia, Tomsk, Lenin str., 3, 634028²Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Russia, Biysk, Sozialisticheskaya str., 1, 659322E-mail: Kiseleva_ea@pharmso.ru

Abstract. *The study of specific pharmacological activity evaluated high antinociceptive efficacy of the first synthesized 2 compounds from the class of hexaazaisowurtzitanes in models of somatogenic pain with different genesis (thermal, visceral pain). The effect of compounds appeared to be comparing and/or exceeding the action of tramadol. The obtained results confirm the possibility of creating new pharmacologically active molecules based on the high-energy substance hexaazaisowurtzitane, which is a domestic priority in world pharmacy.*

Введение. Создание и изучение инновационных молекул на основе нового фармакофора – гексаазаизовюрцитана для разработки безопасных и эффективных анальгетиков является отечественным приоритетным направлением в фармакологии и медицинской химии [1].

Экспериментальная часть. Объектами исследования являются 2 соединения из класса гексаазаизовюрцитанов: 4,10-ди(этоксиацетил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло [5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}] додекан (этовюрцин), 4-(3,4-дибромтиофенилкарбонил)-10-(2-этоксиацетил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5,5,0,0^{3,11},0^{5,9}]додекан (МЗ), впервые синтезированные в ИПХЭТ СО РАН (г. Бийск). Молекулы являются нетоксичными веществами (ЛД₅₀ > 2000 мг/кг при отсутствии летальности). В качестве тест-систем использовали 241 аутбредных самца мышей CD1 (протокол JACUC №192112021). Эвтаназию животных осуществляли в СО₂-камере. Вещества вводили в желудок в дозах 25-200 мг/кг в течение 1-3 сут, последнее введение – за 1 ч до тестирования. Препарат сравнения трамадол вводили в дозе 10 мг/кг *per os*. Мыши контроля получали водно-твиновый раствор при аналогичном пути и режиме введения. Анальгетическую активность объектов исследовали на моделях соматической боли различного генеза: "уксусные корчи" (*abdominal constriction test*), на модели термической боли «горячая пластина (*hot plate*), «тепловой иммерсии» хвоста (*tail immersion*) [2].

Межгрупповые различия оценены с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и углового преобразования Фишера (ϕ). При $p < 0,05$ различия считали значимыми [2].

Результаты. В тесте «уксусные корчи» этоворцин после 3-суточного введения оказывал «куполообразный» обезболивающий эффект с максимально выраженной активностью в дозе 50 мг/кг (86,6%), обусловленной статистически значимым снижением количества «корчей» в 7,5 и 4,5 раза, увеличением времени развития болевой реакции в 2,3 ($P < 0,05$) и 1,8 ($P < 0,05$) раза соответственно относительно значений групп контроля и трамадола (таблица 1). Эффект этоворцина в дозах 25 и 100 мг/кг был сопоставим с активностью референс-препарата.

Таблица 1

Альгетическая активность соединений из класса гексаазаизоворцитанов (25-200 мг/кг per os) при 3-суточном введении в сравнении с трамадолом (10 мг/кг per os) на модели «уксусные корчи» у аутбредных мышей-самцов CDI

Группа наблюдения, доза (количество животных)	Количество «корчей» за 15 мин ($X \pm m$)	Латентное время развития «корчей» ($X \pm m$), сек	Угнетение болевой реакции, %
1 серия экспериментов			
1. Контроль, (n=10)	27,1 \pm 4,9	337 \pm 75	-
2. Трамадол, 10 мг/кг (n=8)	16,5 \pm 2,2*	265 \pm 13	39,1
3. Этоворцин, 25 мг/кг (n=8)	15,0 \pm 3,4*	232 \pm 19	44,7
4. Этоворцин, 50 мг/кг (n=8)	3,6 \pm 1,4**#	622 \pm 143**#	86,6
5. Этоворцин, 100 мг/кг (n=8)	14,0 \pm 1,8*	318 \pm 58	48,4
6. Этоворцин, 200 мг/кг (n=8)	17,0 \pm 4,4	355 \pm 122	37,3
2 серия экспериментов			
1. Контроль, (n=16)	22,6 \pm 2,1	222,2 \pm 17,9	0
2. Трамадол, 10 (n=10)	17,6 \pm 1,8	277,7 \pm 17,0*	22,1
3. Молекула 3, 25 (n=10)	15,0 \pm 3,0*	302,1 \pm 39,0*	33,6
4. Молекула 3, 50 (n=10)	14,5 \pm 3,2*	344,5 \pm 67,3*	35,8
5. Молекула 3, 100 (n=10)	9,6 \pm 1,2***##	293,3 \pm 25,2*	57,5
6. Молекула 3, 200 (n=10)	10,6 \pm 2,5***##	309,2 \pm 25,3**	53,1

Примечание: здесь и далее * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$ по сравнению с трамадолом

Соединение М3 оказало выраженное альгетическое действие во всех исследуемых дозах (таблица 1). Кроме того, активность вещества в дозах 100 (57,5 %) и 200 мг/кг (53,1 %) превышала эффект трамадола (22,1 %) по снижению количества «корчей» в 1,8 раза (100 мг/кг, $p < 0,01$) и 1,7 раза (200 мг/кг, $p < 0,01$), в дозе 200 мг/кг – по статистически значимому увеличению времени развития болевой реакции. Обезболивающее действие М3 в дозах 25 и 50 мг/кг оказалось сопоставимым с трамадолом.

Исследование этоворцина при однократном введении в тесте «горячая пластина» подтвердило его антиноцицептивную активность в дозах 50 и 100 мг/кг (таблица 2). Максимально возможный эффект вещества превышал аналогичный показатель в группе трамадола и составил 55 % (50 мг/кг) и 56,3 % (100 мг/кг). Вместе с тем, обезболивающая активность этоворцина в этих дозах также выражалась в статистически значимом увеличении количества (%) мышей с 30 сек экспозицией до 60 % против 20 % трамадола.

Таблица 2

Анальгетическая активность соединений из класса гексаазаизовюрцитанов (25-200 мг/кг per os) при однократном введении в сравнении с трамадолом (10 мг/кг per os) на моделях термической соматической боли (*hot plate*, *tail immersion*) у аутобредных мышей-самцов CDI

Группа наблюдения, доза (количество животных)	Латентное время развития болевой реакции (X±m), сек	Максимально возможный эффект, %	Количество мышей с 30 с экспозицией, %
1 серия экспериментов (<i>hot plate</i>)			
1. Контроль, (n=13)	22,0 ± 1,9	-	30,8
2. Трамадол, 10 мг/кг (n=10)	22,0 ± 1,9	0	20
3. Этовюрцин, 25 мг/кг (n=10)	26,9 ± 1,3	61,3	40
4. Этовюрцин, 50 мг/кг (n=10)	26,4 ± 1,6*#	55	60
5. Этовюрцин, 100 мг/кг (n=10)	26,5 ± 1,6*#	56,3	60
6. Этовюрцин, 200 мг/кг (n=10)	23,4 ± 1,9	17,5	20
2 серия экспериментов (<i>tail immersion</i>)			
1. Контроль, (n=12)	9,1 ± 1,2	0	0
2. Трамадол, 10 мг/кг (n=10)	19,5 ± 2,1**	49,8	10
3. М3, 25 мг/кг (n=10)	24,9 ± 2,0**	75,4	30**
4. М3, 50 мг/кг (n=10)	21,8 ± 2,6**	60,8	30**
5. М3, 100 мг/кг (n=10)	23,8 ± 2,1**	70,2	40**#
6. М3, 200 мг/кг (n=10)	23,7 ± 2,0**	69,8	10

М3 оказало обезболивающее действие при однократном введении во всех дозах (таблица 2). В группах мышей, получавших М3, показатель латентного времени развития болевой реакции статистически значимо в 2,7 (25 мг/кг), 2,4 (50 мг/кг), 2,6 (100 мг/кг) и 2,6 (200 мг/кг) раза превышал значение контрольной группы. М3 превосходило обезболивающее действие трамадола по количеству мышей с 30 сек экспозицией при введении в дозе 100 мг/кг (40 % против 10 % трамадола, $p < 0,01$).

Заключение. Выявлено, что впервые синтезированные соединения из класса гексаазаизовюрцитанов оказывают выраженное анальгетическое действие на 2 моделях соматической боли различного генеза, превосходящее и/или сопоставимое с активностью трамадола. Полученные результаты подтверждают возможность разработки фармакологически активных молекул на основе гексаазаизовюрцитана.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agüero S., Megy S., Eremina V.V., Kalashnikov A.I., Krylova S.G., Kulagina D.A., Lopatina K. A., Fournier M., Povet'eva T.N., Vorozhtsov A.B., Sysolyatin S.V., Zhdanov V.V., Terreux R. Discovery of a Novel Non-Narcotic Analgesic Derived from the CL-20 Explosive: Synthesis, Pharmacology, and Target Identification of Thiowurtzine, a Potent Inhibitor of the Opioid Receptors and the Ion Channels // ACS Omega. – 2021. – Vol. 6, № 23. – P. 15400-15411.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронова [и др.] – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.

УДК 159.9

**АССОЦИАЦИЯ ИНТЕРНЕТ-ЗАВИСИМОСТИ И ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ
ГЕНОВ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ (RS4680 COMT И RS1044396 CHRNA4) У ПОДРОСТКОВ**

К.В. Копылова

Научный руководитель: к.б.н., М.В. Смольникова

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера СО РАН,

Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г, 660022

e-mail: kсениya.kopylova@yandex.ru

**ASSOCIATION OF THE INTERNET ADDICTION AND SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS
OF NEUROTRANSMITTERS' GENES (RS4680 COMT AND RS1044396 CHRNA4)
IN ADOLESCENTS**

K.V. Kopylova

Scientific Supervisor: PhD, M.V. Smolnikova

Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Russia, Krasnoyarsk, Partisana Zheleznyaka str.

3g, 660022

e-mail: kсениya.kopylova@yandex.ru

Abstract. *Internet addiction (IA) is a psychological phenomenon attributed to vulnerable groups, especially adolescents. The prevalence of IA among adolescents varies depending on the studied ethno social groups and the diagnostic criteria. The aim of this study was to study the prevalence of rs4680 COMT and rs1044396 CHRNA4 genotypes in Internet-dependent adolescents in populations of Caucasians and Khakas, depending on the severity of pathological dependence. The study included 345 adolescents from Krasnoyarsk and Abakan, age from 12 to 18 years. It is shown that genotypes containing the allele variant G rs4680 COM predominate in Khakass adolescents, in regard v of the severity of Internet addiction compared with the group of adolescents of Russian nationality. Allelic variant G of the COMT rs4680 gene is accompanied by an increase in the activity of the COM enzyme and a decrease in dopamine concentration, which causes a tendency to aggression and a greater manifestation of impulsivity.*

Введение. Увеличение доли интернет-пользователей по всему миру приводит к появлению актуальной проблемы избыточного, а в некоторых случаях патологического использования интернета и онлайн-игр. При обследовании студентов с близкими социально-культурными условиями жизни, показана большая частота встречаемости интернет-зависимости (ИЗ) у представителей азиатских национальностей (8,6 %) в сравнении с неазиатами (3,8 %) [1]. Наиболее выраженная коморбидность интернет-зависимости встречается с суицидальным поведением, депрессией и тревожностью.

Сфера исследований, затрагивающих роль генетической предрасположенности к особенностям структуры нейромедиаторов центральной нервной системы и взаимосвязи с интернет-зависимостью, быстро расширяется. Так, дофамин играет важную роль в процессе потребления контента на электронных устройствах, вызывая ощущение счастья и мотивируя на поиск источника удовольствия. В распаде дофамина принимает участие фермент катехол-о-метилтрансфераза (COMT), превращающий

его в 3-метокситирами. Ген *COMT* рассматривается как потенциально важный для понимания генетической этиологии различных психических расстройств. Аллель А *COMT* rs4680 приводит к замене в молекуле белка аминокислоты валин (Val) на метионин (Met), что приводит к значительному снижению активности фермента и, соответственно, к увеличению концентрации дофамина. Аллель G rs4680 ассоциирован с более высокой активностью *COMT*, что сопровождается снижением уровня дофамина. Проведенный мета-анализ гена *COMT* показал, что синдром дефицита внимания с гиперактивностью и паническое расстройство связаны с аллелем Val rs4680 у европеоидов.

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор для передачи нервных импульсов активируется ацетилхолином и никотином, а ген данного рецептора (*CHRNA4*) вовлечен в патогенез никотиновой и алкогольной зависимости. Показано наличие ассоциации генотипа CC *CHRNA4* rs1044396 с интернет-зависимостью. Результаты анализа показали, что группа интернет-зависимых мужчин имела более низкую частоту T аллеля rs1044396 гена *CHRNA4* по сравнению с контрольной группой, что позволяет предполагать, что данный аллельный вариант является протективным в отношении развития ИЗ [2]. Однако, даже при наличии множества литературных источников, стоит отметить небольшое количество публикаций, целью которых является поиск взаимосвязи между генетической предрасположенностью к интернет-зависимости и вовлеченности в развитие ИЗ этнической принадлежности обследуемых лиц.

Целью настоящего исследования было изучение распределения генотипов rs4680 *COMT* и rs1044396 *CHRNA4* у интернет-зависимых подростков в популяциях европеоидов и хакасов в зависимости от тяжести патологической зависимости.

Экспериментальная часть. В исследовании были включены 345 школьников (48 % мальчиков, 52 % девочек) из городов Ангаро-Енисейского макрорегиона (Красноярск, Абакан) в возрасте от 12 до 18 лет. Распределение подростков по месту проживания и национальности указано в Таблице 1. Подростки были протестированы с помощью шкалы интернет-зависимости Чена (CIAS), и затем на основании результатов тестирования были разделены на группы: адаптивные интернет-пользователи (АИП) (27-42 балла), неадаптивные интернет-пользователи (НИП) (43-64 балла) и патологические интернет-пользователи (ПИП) (≥ 65 баллов). Генотипирование rs4680 *COMT* и rs1044396 *CHRNA4* проводилось с использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР). Соответствие частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга было проверено с использованием χ^2 . Отношение шансов (OR) с 95 %-ным доверительным интервалом (ДИ) проводилось для оценки связи между генетическими маркерами патологии и различными степенями тяжести.

Результаты. Частоты исследуемых в работе генов, ассоциированных с формированием интернет-зависимости по данным литературных источников, могут значительно отличаться в различных этнических группах. В результате проведения сравнительного анализа частот генотипов изучаемых полиморфизмов у подростков с разной степенью интернет-зависимости, различающихся территорией проживания и национальностью, были выявлены статистически значимые отличия для полиморфизма rs4680 *COMT* (Таблица 1). Так, аллельный вариант G rs4680 *COMT* преобладает у хакасских подростков вне зависимости от степени выраженности интернет-зависимости по сравнению с подростками русской национальности. По результатам тестирования подростки имели разную степень тяжести из: АИП – 179 (51,9 %), НИП – 82 (23,8 %), ПИП – 84 (24,3 %). Важным является и то, что между группой русских подростков ПИП (45,5 %) и аналогичной группой хакасов (63,8 %) наблюдаются значимые отличия (OR 0,47,

$p = 0,024$). В распределении аллельных вариантов rs4680 *COMT* у интернет зависимых подростков в зависимости от тяжести, согласно шкале CIAS, статистически значимых отличий не выявлено.

Таблица 1

Распространенность аллелей rs4680 *COMT* и rs1044396 *CHRNA4* у подростков в зависимости от национальности (%)

Территория/национальность	Аллель		P
	A rs4680	G rs4680	
Красноярск (n = 196)	52,8	47,2	0,009
Абакан (n = 150)	42,7	57,3	
Русские (n = 242)	51,0	49,0	0,016
Хакасы (n = 71)	39,4	60,6	
	C rs1044396	T rs1044396	p>0,05
Красноярск (n = 196)	49,2	50,8	
Абакан (n = 150)	54,0	46,0	
Русские (n = 242)	49,8	50,2	
Хакасы (n = 71)	56,3	43,7	

В распределении аллельных вариантов rs1044396 *CHRNA4* у интернет-зависимых подростков разной национальности и с разной степенью тяжести ИЗ статистически значимых отличий не выявлено.

Заключение. Все больше доказательств свидетельствует о том, что генетические, этнические и личностные факторы участвуют в развитии и поддержании ИЗ, но нейробиологический механизм исследован недостаточно. Патологическая интернет-зависимость относится к группе мультифакториальных полигенных заболеваний, где имеет место сочетание особенностей функционирования высшей нервной деятельности и факторов окружающей среды. В текущем исследовании при изучении частоты вариантов полиморфизмов генов *COMT* and *CHRNA4* показано, что аллель G rs4680 *COMT*, ассоциированный с более высокой активностью фермента катехол-о-метилтрансферазы, чаще встречается среди группы хакасов, которые по шкале CIAS были отнесены к патологическим интернет-пользователям. Таким образом, подростки, носители этого аллеля, имеют большую вероятность развития и других патологических зависимостей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luczak S. E., Khoddam R., Yu S. [and others.]. Review: Prevalence and co-occurrence of addictions in US ethnic/racial groups: Implications for genetic research // *The American Journal on Addictions*. – 2017. – V. 26., № 5. – P. 424-436.
2. Jeong J.-E., Rhee J.-K., Kim T.-M. [and others.]. The association between the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ subunit gene (*CHRNA4*) rs1044396 and Internet gaming disorder in Korean male adults // *PloS One*. – 2017. – V. 12., № 12. – P. e0188358.

УДК 618.19-006.6-08:615.28:575.113

**ИЗМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛАНДШАФТА ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ АНТРАЦИКЛИН-СОДЕРЖАЩИХ СХЕМ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ
ХИМИОТЕРАПИИ**

Е.А. Кравцова, К.А. Гаптулбарова, Д.С. Долгашева

Научный руководитель: к.б.н., М.К. Ибрагимова

НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

E-mail: zdereva.e@gmail.com

**CHANGES IN THE GENETIC LANDSCAPE OF BREAST TUMOR UNDER THE ACTION OF
ANTHRACYCLINE-CONTAINING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY REGIMENS**

E.A. Kravtsova, K.A. Gaptulbarova, D.S. Dolgasheva

Scientific Supervisor: PhD, M.K. Ibragimova

Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kooperativny Lane, 5, 634009

E-mail: zdereva.e@gmail.com

***Abstract.** In the structure of oncological morbidity and mortality in women around the world, breast cancer (BC) occupies a leading position. To date, when building tactics for the treatment of breast cancer, a personalized approach to the appointment of neoadjuvant chemotherapy (NAC) is chosen, which serves to reduce the volume of the primary tumor and transfer it to an operable state to improve treatment outcomes. To this end, it is necessary to study the features of the influence of various preoperative treatment regimens on the genetic landscape of the tumor, which can determine both a favorable outcome and stimulation of metastasis.*

Введение. На сегодняшний день одними из наиболее эффективных и часто используемых цитостатиков для лечения рака молочной железы в неoadьювантном режиме являются антрациклин-содержащие препараты. Целью работы является изучение изменения CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы при применении антрациклин-содержащих схем НХТ в зависимости от ответа на предоперационную химиотерапию и статуса гематогенного метастазирования.

Экспериментальная часть. В исследование включено 35 больных люминальным В HER2-негативным подтипом РМЖ с морфологически верифицированным диагнозом и клинической стадией ПА–ПВ. Все пациентки получали 4-8 курсов НХТ по схемам FAC/AC, CAH. Для анализа аббераций числа копий (CNA) проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 8.0» (StatSoft Inc., USA).

Результаты. В рамках изучения особенностей CNA-ландшафта опухоли до лечения был проведен анализ распределения частот CNA в группе пациенток, включенных в исследование, в зависимости от ответа на предоперационную химиотерапию. У 23 пациенток зарегистрирована частичная или полная регрессия опухоли (группа 1 - до лечения, группа 1.1 - после НХТ), и у 12 больных - стабилизация или прогрессирование опухолевого процесса (группа 2 - до лечения, группа 2.1 - после НХТ). В результате

сравнения частот встречаемости CNA в 1 и 2 группах показано, что наличие объективного ответа на НХТ в группе 1 наблюдалось при большем количестве делеций (78,3 %) в 11q22.3 и 11q23.1 регионах по сравнению с пациентками группы 2 (частота делеций 15,0 %) ($p = 0,00238$). Потенциально данные локусы могут выступать в качестве предиктивного маркера объективного ответа при применении в режиме предоперационной химиотерапии антрациклин-содержащих схем.

Далее были изучены особенности CNA-ландшафта опухоли после лечения в зависимости от ответа на предоперационную химиотерапию. Для пациенток группы 1.1 наибольшее количество амплификаций (47,8 %) обнаружено в локусах 1q32.1-32.3, 1q41, 1q42.11-42.13, 1q42.2, 1q42.3, 8q22.3, 8q23.3 при отсутствии делеций, делеций (34,8 %) - в локусах 8p23.2, 11q21, 11q22.1-22.3, 11q23.1-23.3, 11q24.1, 11q24.2. Сравнение частот CNA в группе с частичной и полной регрессией опухоли при применении антрациклин-содержащих схем НХТ: в локусах 1q32.1 и 1q32.2 частота амплификаций статистически значимо снизилась с 82,6 % в опухоли до лечения до 41,7 % в опухоли после лечения ($p=0,0001$). Также в процессе проведения НХТ частота делеций снизилась в локусах 17p13.3 и 17p13.1 (78,3 % и 30,4 % / до и после НХТ, соответственно; $p=0,00023$). Для пациенток группы 2.1 установлено наибольшее количество амплификаций (75,0 %) в локусах 1q21.3, 1q22, 1q23.1-23.3 при отсутствии делеций. Наибольшая частота делеций (58,3 %) обнаружена в локусах 16q21 и 16q22.1. Сравнение частот CNA в группе со стабилизацией и прогрессированием опухолевого процесса при применении антрациклин-содержащих схем НХТ: в 6p12.2 регионе частота амплификаций увеличилась с 0 % в опухоли до лечения до 25,0 % в опухоли после проведения НХТ ($p = 0,001$). Также в процессе проведения НХТ частота делеций увеличилась в локусе 6p11.1 (0 % и 25,0 % / до и после НХТ, соответственно; $p = 0,001$). Общая картина частоты встречаемости CNA у больных РМЖ до и после лечения, которым в режиме предоперационной химиотерапии были применены антрациклин-содержащие схемы в зависимости от эффекта НХТ, представлена на рисунке 1.

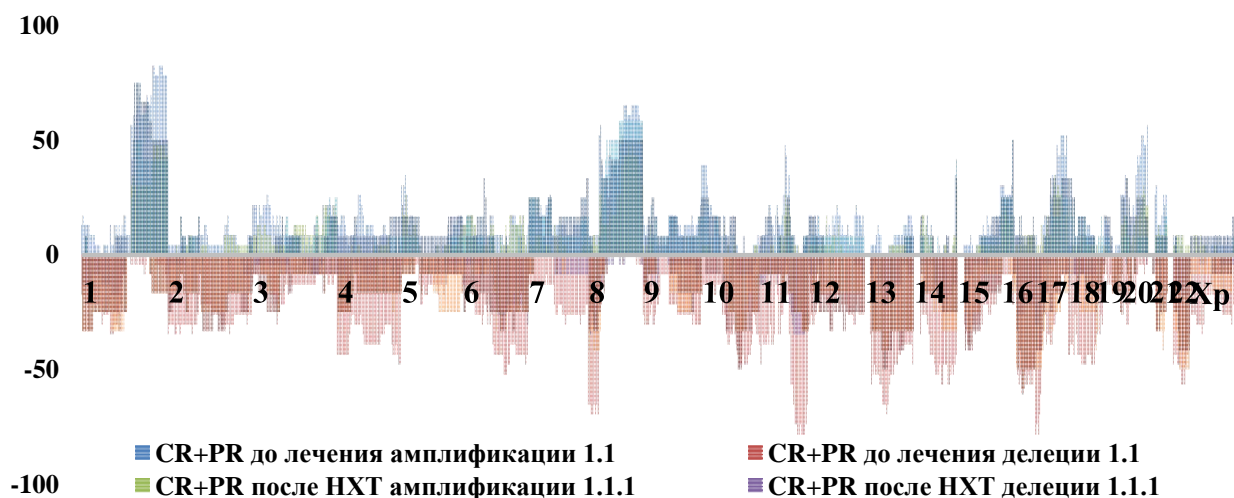


Рис. 1. Частота встречаемости CNA у больных РМЖ до и после лечения, которым в режиме предоперационной химиотерапии были применены антрациклин-содержащие схемы (FAC/AC, CAH), в зависимости от эффекта НХТ. Примечание: Стабилизация и прогрессирование - SD+P; частичная и полная регрессия - CR+PR

Был проведен анализ распределения частот CNA в группах пациенток до и после лечения в зависимости от наличия гематогенного метастазирования. В исследуемой группе у 13 пациенток (37,1 %) зарегистрировано возникновение гематогенного метастазирования (среднее время $45,7 \pm 0,4$ мес. (min-max: 4-130)). В результате сравнения частот встречаемости CNA в группе пациенток до лечения показано, что возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве амплификаций в 18q11.2, 18q12.1 и 18q12.2 регионах, в частности у 23,0 % пациенток с наличием гематогенного метастазирования идентифицирована амплификация данных регионов при полном отсутствии амплификаций в них в группе пациенток без гематогенного метастазирования ($p = 0,035$). В результате сравнения частот встречаемости CNA после лечения показано, что возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве амплификаций в 9p22.2 регионе (0 % до лечения / 38,5 % после НХТ) ($p=0,00229$). Установлено, что возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве делеций в 9p21.3 регионе (0 % до лечения / 23,1 % после НХТ) ($p = 0,053$). Данные локусы могут выступать в качестве прогностического маркера возникновения гематогенного метастазирования у больных люминальным В РМЖ при назначении антрациклин-содержащих схем НХТ. На рисунке 2 представлена частота встречаемости CNA у больных РМЖ до и после лечения в зависимости от статуса гематогенного метастазирования.

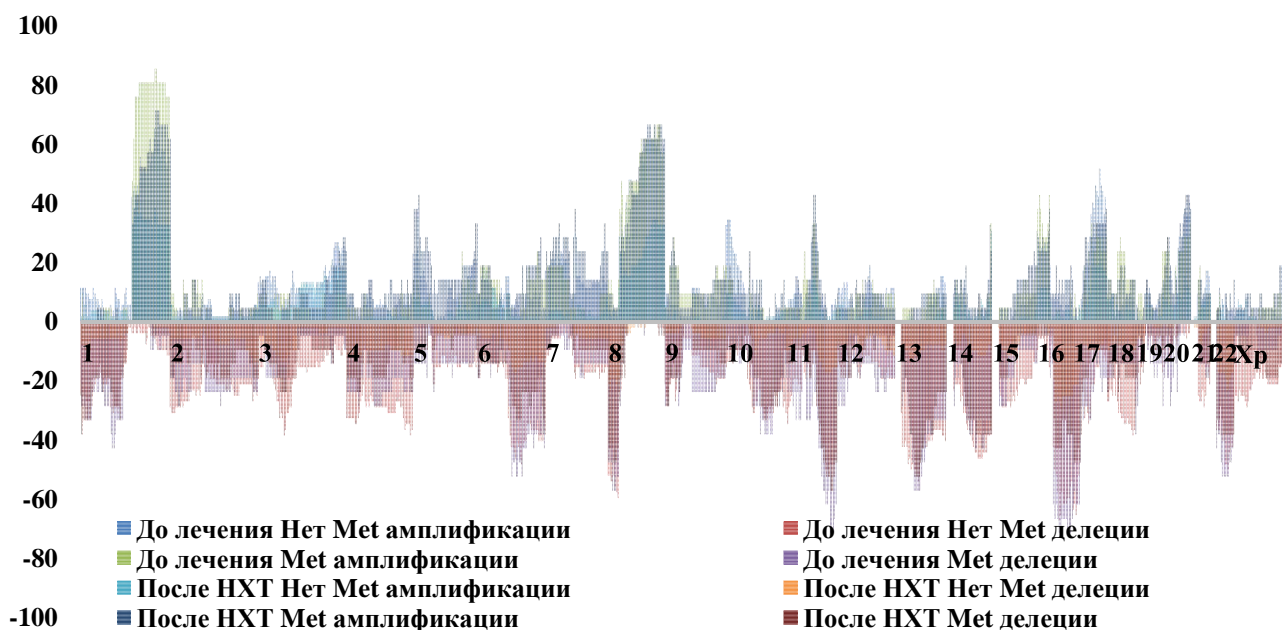


Рис. 2. Частота встречаемости CNA у больных РМЖ, которым в режиме предоперационной химиотерапии были применены антрациклин-содержащие схемы (FAC/AC, CAH), до и после лечения в зависимости от наличия гематогенного метастазирования. Примечание: Нет Met – отсутствие гематогенного метастазирования; Met – наличие гематогенного метастазирования

Заключение. Выявлены потенциальные предиктивные маркеры объективного ответа и прогностические маркеры возникновения гематогенного метастазирования при РМЖ при применении антрациклин-содержащих схем в режиме предоперационной химиотерапии.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 22-25-00499).

УДК 612.17

**ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ АМРК НА ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ
ХРОНИЧЕСКОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ ПРИ ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННОМ
МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ**

Б.К. Курбатов, И.А. Дергачев

Научный руководитель: профессор, д.м.н., Л.Н. Маслов

НИИ кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр,

Россия, г. Томск, ул. Киевская, 111А, 634050

E-mail: bobersanker@gmail.com

**THE IMPACT OF AMPK ACTIVATION ON THE INFARCT-LIMITING EFFECT OF CHRONIC
NORMOBARIC HYPOXIA IN DIET-INDUCED METABOLIC SYNDROME**

B.K. Kurbatov, I.A. Derkachev

Scientific Supervisor: Prof., Dr., L.N. Maslov

Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kievskay str., 111a, 634050

E-mail: bobersanker@gmail.com

***Abstract.** Currently, in-hospital mortality in patients with acute myocardial infarction (AMI) in Russia is 6 %. Metabolic syndrome (MS) is one of main comorbid disease in patients with acute myocardial infarction. MS increases mortality in patients with AMI. Consequently, it is needed developing new approaches for treatment of AMI. The study of the cardioprotective effect of adaptation to chronic normobaric hypoxia could contribute to solving this problem. It was studied the effect of diet-induced metabolic syndrome on the cardioprotective effect of adaptation to chronic normobaric continuous hypoxia. Thus, it was shown that metabolic syndrome reduces the infarct-limiting effect of chronic normobaric hypoxia, but does not completely eliminate it. AMPK (AMP-sensitive protein kinase) activation by metformin reduced the serum leptin and adiponectin levels, but did not abolish the infarct-limiting effect of chronic normobaric hypoxia. Consequently, the activation AMPK cannot be used to abolish negative effects of MS.*

Введение. Острый инфаркт миокарда (ОИМ) до сих пор является одним из основных причин смертности и инвалидизации населения [1]. На данный момент одним из перспективных способов способствующих уменьшению ишемически/реперфузионных повреждений наблюдаемых при ОИМ, является адаптация к хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ) [2]. На данный момент поиск механизмов реализации кардиопротективного эффекта ХННГ, способствует поиску новых фармакологических мишеней и разработке новых подходов для предупреждения ишемически-реперфузионных повреждений сердца. На данный момент нарушение углеводного и липидного обменов в современном обществе принимает форму эпидемии. Одним из основных коморбидных заболеваний у пациентов с ОИМ является метаболический синдром [3]. Установлено, что гипергликемии и ожирение нарушает адаптацию организма к экстремальным воздействиям [4]. Таким образом, на данный момент актуальным является изучение механизмов нарушения эффективности кардиопротекторных механизмов адаптациях, а именно ХННГ, а также разработка способов коррекции этих нарушений. Целью данного исследования является: оценка

эффективности кардиопротекторного эффекта ХННГ у животных с высокоуглеводной высокожировой диетой (ВУВЖД), а также их коррекция с помощью нормализации углеводного обмена путём активации АМПК (AMP-sensitive protein kinase).

Экспериментальная часть. Работа выполнена на самках крыс линии Вистар. Животные были разделены на 4 группы: Контрольные, ХННГ, ВУВЖД, ВУВЖД+ХННГ. Моделирование ХННГ производилось помещением животных в герметичную камеру на 21 день с содержанием кислорода 12%. Моделирование метаболического синдрома у животных производилось с помощью высокоуглеводной высокожировой диеты в течение 84 дней. Размер инфаркта выражали в процентах от размера зоны гипоперфузии (область риска), как ЗН/ОР. Для нормализации уровня глюкозы в сыворотке крови в питьевую воду добавляли активатор АМПК метформин (200 мг/кг/сутки 21 день). Глюкозу, триглицериды, холестерин в сыворотке крови определяли ферментативным колориметрическим методом с помощью наборов. Содержание лептина, адипонектина, кортикостерона, инсулина в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 13.0 (StatSoft, Inc.). При сравнении нескольких независимых выборок количественных данных применяли two-way ANOVA с последующим применением апостериорного критерия Фишера. Пороговое значение достигнутого уровня значимости p принимали равным 0,05.

Результаты. У животных, содержащихся на ВУВЖД, происходит повышение уровня глюкозы, инсулина, триглицеридов, лептина и адипонектина в сыворотке крови, а также НОМА-IR, по сравнению с контрольным животным (Таблица 1). Адаптация к ХННГ на фоне ВУВЖД предупреждает увеличение содержания глюкозы, триглицеридов, холестерина, и увеличение индекса НОМА-IR. Изменений в содержании инсулина в сыворотке не было обнаружено. На фоне ХННГ у животных с ВУВЖД снижается уровень адипонектина (Таблица 1).

Таблица 1

Биохимические показатели у животных с диета-индуцированным метаболическим синдромом

	1 Контроль n=12	2 ХНГ, n=11	3 МС, n=12	4 МС + ХНГ, n=12	5 МС + ХНГ + метформин, n=8
Глюкоза, мМ/л	4,55±0,34	5,02±0,46 p1>0,05	5,32±0,30 p1=0,05	4,36±0,39 p2>0,05	4,6±0,29 p4<0,05
Глюкозо-толерантный тест (AUC)	709±13	723±26 p1>0,05	761±12 p1=0,012	725±13 p2>0,05	725±25 p4<0,05
Инсулин, пМ/л	8,02±0,57	9,78±0,71 p1>0,05	10,37±0,45 p1=0,05	11,80±0,98 p1=0,002	10,58±1,26 p4<0,05
НОМА-IR	1,78±0,14	2,14±0,14 p1>0,05	2,48±0,13 p1=0,03	2,25±0,26 p2>0,05	2,20±0,30 p4<0,05
Триглицериды сыворотки, мМ/л	1,01±0,15	1,25±0,16 p1>0,05	1,57±0,29 p1=0,036	1,31±0,15 p2>0,05	1,30±0,16 p4<0,05
Холестерин сыворотки, мМ/л	4,30±0,44	5,34±0,69 p1>0,05	6,71±1,24 p1=0,034	5,62±0,68 p2>0,05	5,56±0,68 p4<0,05
Лептин, нг/мл	1,77±0,26	1,34±0,11 p1>0,05	5,37±0,74 p1<0,001	5,89±0,55 p1<0,001 p2<0,001	2,50±0,41 p3<0,001 p4<0,001
Адипонектин, мкг/мл	9,83±0,70	6,45±0,89	17,85±2,47 p1<0,001	12,73±1,25 p1>0,05 p2=0,03 p3<0,001	6,96±0,84 p3<0,001 p4=0,009

Примечание: n – количество животных в группе, p – значимость различий по отношению к соответствующей группе, two way ANOVA, апостериорный тест Фишера.

Адаптация крыс к ХННГ животных вызывало снижение размера ЗН/ОР на 43 % (Таблица 2). Полученные данные демонстрирует, что адаптация к ХННГ обладает выраженным инфаркт-лимитирующим действием. ХННГ сохраняет свой кардиопротекторный эффект и у животных с МС, но эффект был менее выражен, так у животных на ВУВЖД адаптированных к ХННГ уменьшение ЗН/ОР составило 25% процентов (Таблица 2). Использование активатора АМРК не оказало эффекта на ЗН/ОР. Следовательно, активация АМРК не может быть использована для устранения негативного проявления МС.

Таблица 2

Влияние диета-индуцированного метаболического синдрома на размер инфаркта

	1 Контроль, n=12	2 ХНГ, n=11	3 МС, n=12	4 МС + ХНГ, n=12	5 МС + ХНГ + метформин
Зона риска, мг	257,25±20,53	268,89±18,11	329,42±25,51 p1=0,019	241,34±19,07 p3=0,004	250,0±22,38
Зона некроза, мг	120,17±10,34	73,39±12,29 p1=0,023	170,96±20,04 p1=0,012	93,73±9,92 p3<0,0001	103,1±18,99
ЗН/ЗР,%	46,92±2,24	26,50±3,52 p1<0,0001	51,25±3,70	38,29±2,04 p1=0,042 p2=0,007 p3=0,003	39,2±4,75

Примечание: n – количество животных в группе, p – значимость различий по отношению к соответствующей группе, two way ANOVA, апостериорный тест Фишера.

Заключение. Диета-индуцированный метаболический синдром у самок крыс снижает кардиопротекторный эффект адаптации к ХННГ. Применение метформина не корректирует ослабление инфаркт-лимитирующего эффекта ВУВЖД у животных адаптированных к ХННГ.

Работа поддержана грантом РФФ 22-15-00048.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bessonov I.S. Influence of Total Ischemic Time on Clinical Outcomes in Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction // Kardiologia. – 2021. – Vol. 61, № 2. – P. 40-46.
2. Naryzhnaya N.V. Receptor mechanism of infarct-limiting effect of adaptation to normobaric hypoxia // Bull. Sib. Med. – 2021. – Vol. 19, № 4. – P. 138-142.
3. Megaly M. Use of Intravascular Imaging in Patients With ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction // Cardiovasc. Revascularization Med. – 2021. – Vol. 30. – P. 59-64.
4. Andreadou I. Hyperlipidaemia and cardioprotection: Animal models for translational studies // Br. J. Pharmacol. – 2020. – Vol. 177, № 23. – P. 5287-5311.

УДК 616-008

**АССОЦИАЦИИ ХАРАКТЕРИСТИК УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА С БЕЛКАМИ ЛЕГОЧНОГО
СУРФАКТАНТА SP-A И SP-D В ПОПУЛЯЦИИ ГОРОДА НОВОСИБИРСК**Я.К. Лапицкая¹, И.А. Косарев², Ш.Т. Насирова¹

Научный руководитель: профессор, д.м.н., К.Ю. Николаев

¹Новосибирский государственный университет,

Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д.2, 630090

²НИИ институт терапии и профилактической медицины – филиал ИЦиГ СО РАН»

Россия, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1, 630089

E-mail: y.lapitskaya@g.nsu.ru**ASSOCIATIONS OF CARBOHYDRATE METABOLISM CHARACTERISTICS WITH LUNG
SURFACTANT PROTEINS SP-A AND SP-D IN THE POPULATION OF NOVOSIBIRSK**Y.K. Lapitskaya¹, I.A. Kosarev², S.T. Nasirova¹

Scientific Supervisor: Prof., Dr., K.Yu. Nicolayev

¹Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogova str., 2, 630090²Research Institute of Internal and Preventive Medicine–Branch ICG, SB RAS, Russia, Novosibirsk, B. Bogatkova
str., 175/1, 630089E-mail: y.lapitskaya@g.nsu.ru

Abstract. *The objective of this study is to assess the association of the lung surfactant proteins SP-A and SP-D and the characteristics of carbohydrate metabolism in the population of Novosibirsk. 174 people (87 men and 87 women), aged 45 to 69 years, randomly selected in the population of Novosibirsk, were examined. The average age of the examined persons was 56.1 years. We found: In the general population of Novosibirsk, a direct association of the lung surfactant protein SP-A with hyperglycemia corresponding to the criteria of diabetes mellitus in all examined individuals was determined. In the Novosibirsk population, an inverse association of SP-D with fasting glycaemic disorders was revealed.*

Введение. Неотъемлемой частью поддержания физиологического гомеостаза бронхолегочной системы являются белки легочного сурфактанта SP-A и SP-D [1]. Они играют важную роль в иммунном ответе, участвуя в элиминации чужеродных агентов [1, 2]. Противовоспалительное действие белков легочного сурфактанта SP-A и SP-D подтверждено многочисленными исследованиями [1, 2]. Белки легочного сурфактанта SP-A и SP-D способствуют поглощению апоптотических клеток врождёнными иммунными клетками и регулируют выработку цитокинов, свободных радикалов. Это позволяет реализовать их уникальную роль в регуляции иммунитета легких [2].

Актуальность данного исследования обусловлена тем, что белки легочного сурфактанта SP-A и SP-D включены не только в этиопатогенез бронхолегочных заболеваний, но и в этиопатогенез заболеваний экстрапульмональных органов и систем [3]. При этом, их возможное участие в процессах углеводного обмена ранее не оценивалось.

Целью данного исследования является оценка связей белков легочного сурфактанта SP-A и SP-D и характеристиками углеводного обмена в популяции города Новосибирск.

Экспериментальная часть. Обследовано 174 человека (87 мужчин и 87 женщин), в возрасте от 45 до 69 лет, отобранных случайным образом в популяции г. Новосибирск. Средний возраст обследованных лиц составил $56,1 \pm 7,2$ лет ($M \pm SD$). Обследованные мужчины и женщины не различались по возрасту ($56,4 \pm 7,1$ лет и $55,9 \pm 7,3$ лет, соответственно ($p = 0,613$)).

Содержание белков легочного сурфактанта SP-A и SP-D в сыворотке крови определялось методом иммуноферментного анализа на анализаторе MultiscanEX (Финляндия) с использованием тест-систем BioVendor и Cusabio Biotech (США). Уровень глюкозы крови определялся энзиматическим методом с использованием стандартных реактивов «БИОКОН», Germany.

Статистическая обработка сформированной базы данных проводилась с помощью пакета статистических программ SPSS, версия 13. Определение характера распределения количественных признаков проводилось методом Колмогорова–Смирнова и на основании полученных результатов использовались параметрические и непараметрические методы описательной статистики. Статистическую значимость различий средних показателей оценивали по t-критерию Стьюдента для нормально распределенных признаков. Для непрерывных показателей описательная статистика приведена как медиана и межквартильный размах – Me [25 %; 75 %]. Полученные данные представлялись как абсолютные и относительные величины (n, %) для категориальных переменных. При оценке сопряженности качественных признаков использовался критерий χ^2 Пирсона. Корреляционный анализ проводился с использованием критерия Спирмена и процедуры парциального корреляционного анализа. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимался равным 0,05.

Результаты. Результаты оценки показателей углеводного обмена у обследованных лиц представлены в таблице (таблица 1).

У мужчин определена тенденция к увеличению доли обследованных лиц с гликемией, соответствующей критериям сахарного диабета по сравнению с женщинами.

В общей выборке всех обследованных лиц выявлена обратная ассоциация белка легочного сурфактанта SP-A с глюкозой крови ($r = -0,204$, $p = 0,007$), а также обратная связь белка легочного сурфактанта SP-D с нарушениями гликемии натощак (глюкоза венозной крови $\geq 6,1 < 7,0$ ммоль/л) ($r = -0,166$, $p = 0,028$). У мужчин определена обратная ассоциация белка легочного сурфактанта SP-A с нарушениями гликемии натощак ($r = -0,224$, $p = 0,037$), а у женщин белок легочного сурфактанта SP-A обратно связан с гипергликемией натощак, соответствующей критериям сахарного диабета (глюкоза венозной крови $\geq 7,0$ ммоль/л) ($r = -0,234$, $p = 0,029$). Определено, что среди всех обследованных лиц белок легочного сурфактанта SP-A не превышающий среднюю арифметическую величину M , определенную для данной выборки (1134 пг/мл) прямо ассоциирован с гипергликемией, соответствующей критериям сахарного диабета ($r = 0,153$, $p = 0,044$).

Таблица 1

Характеристика состояния углеводного обмена у обследованных мужчин и женщин в возрасте 45-69 лет

Характеристика	Мужчины (1) (n=87)	Женщины (2) (n=87)	Оба пола (n=174)	P1-2
Нормальные показатели глюкозы (глюкоза венозной крови <6,1 ммоль/л), n (%)	51 (58,6)	58 (66,7)	109 (62,6)	0,174
Нарушения гликемии натощак (глюкоза венозной крови $\geq 6,1 < 7,0$ ммоль/л), n (%)	21 (24,1)	21 (24,1)	42 (24,1)	1
Глюкоза венозной крови $\geq 7,0$ ммоль/л, n (%)	15 (17,2)	8 (9,2)	23 (12,9)	0,089

Заключение. 1. В общей популяционной выборке г. Новосибирск была определена прямая ассоциация белка легочного сурфактанта SP-A с гипергликемией, соответствующей критериям сахарного диабета у всех обследованных лиц. ($r = 0,153$, $p = 0,044$). В популяционные выборки г. Новосибирск выявлена обратная связь SP-D с нарушениями гликемии натощак ($r = -0,166$, $p = 0,028$).

2. У мужчин из популяционной выборки г. Новосибирск выявлена обратная ассоциация белка легочного сурфактанта SP-A с нарушениями гликемического обмена ($r = -0,224$, $p = 0,037$).

3. У женщин из популяционной выборки г. Новосибирск определена связь белка легочного сурфактанта SP-A с гипергликемией натощак, соответствующей критериям сахарного диабета ($r = 0,153$, $p = 0,044$).

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-25-00670, <https://rscf.ru/project/22-25-00670/>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vieira F, Kung J.W., Bhatti F. Structure, genetics and function of the pulmonary associated surfactant proteins A and D: The extra-pulmonary role of these C type lectins // Ann Anat. – 2017, – Vol. 211. – P. 184-201.
2. Watson A., Madsen J., Clark H.W. SP-A and SP-D: Dual Functioning Immune Molecules With Antiviral and Immunomodulatory Properties // Front Immunol. – 2021, –Vol. 11. – P. 622598.
3. Nayak A., Dodagatta-Marri E., Tsolaki A.G., Kishore U. An Insight into the Diverse Roles of Surfactant Proteins, SP-A and SP-D in Innate and Adaptive Immunity // Front Immunol. – 2012. – Vol. 3. – P. 131.

УДК 616.995.122

**ИНФЕКЦИИ ТРЕМАТОДАМИ OPISTHORCHIS VIVERRINI, OPISTHORCHIS FELINEUS
И CLONORCHIS SINENSIS ВЫЗЫВАЮТ ВИДОСПЕЦИФИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЕЙ
ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПЕЧЕНИ ХОМЯЧКОВ MESOCRICETUS AURATUS**

Е.А. Лишай

Научный руководитель: д.б.н., М.Ю. Пахарукова

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,

Россия, г. Новосибирск, Пирогова, д.1, 630090

E-mail: lishai.ekaterina@gmail.com

**TREMATODES OPISTHORCHIS VIVERRINI, OPISTHORCHIS FELINEUS, AND CLONORCHIS
SINENSIS CAUSE SPECIES-SPECIFIC CHANGES IN THE GENE EXPRESSION
IN THE HAMSTER LIVER**

E.A. Lishai

Scientific Supervisor: Dr. M.Y. Pakharukova

Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogova str., 1, 630090

E-mail: lishai.ekaterina@gmail.com

Abstract. *The trematodes Opisthorchis felineus, Opisthorchis viverrini and Clonorchis sinensis are parasites of the hepatobiliary system of mammals, including humans. The species have different carcinogenic potential: O. viverrini and C. sinensis are assigned to group IA biological carcinogens, while O. felineus belongs to group 3A. Using the analysis of RNA-seq data, species-specific differences in gene expression in the liver of Mesocricetus auratus hamsters infected with O. felineus, O. viverrini, and C. sinensis were revealed. During infection with C. sinensis, a change in the largest number of genes was observed – 3148 out of 16768 genes. In addition to the pathways common for the three infections, along which the enrichment of differentially expressed genes is observed (the inflammatory response, IL2 STAT5 signaling, TNFA signaling via NFkB, etc.), unique signaling pathways for each infection were also found. Significant enrichment in the FoxO and hypoxia pathways was observed during O. viverrini infection, in the p53 signaling pathway and the relaxin signaling pathway during C. sinensis infection, and in the TNF- and ErbB signaling pathways during O. felineus infection.*

Введение. *Opisthorchis viverrini, Opisthorchis felineus и Clonorchis sinensis* - это черви семейства Opisthorchiidae, паразитирующие в желчных протоках млекопитающих, в том числе и человека. Канцерогенный потенциал трематод различается. *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* признаны биологическими канцерогенами 1 группы опасности, а *Opisthorchis felineus* относят к 3 группе. Различный канцерогенный потенциал трематод может быть связан с различным изменением экспрессии генов и активацией клеточных путей в клетках печени хозяина, которое наблюдается при инфекции. Ранее было показано, что при трематодозах происходят различные изменения экспрессии генов, например, при инфекции *C. sinensis* была выявлена активация генов иммунного ответа на стадии ранней инфекции и их подавление на более поздних сроках инфекции [1], а при инфекции *O. viverrini* наблюдали изменение уровней экспрессии металлопротеиназ, тканевых ингибиторов металлопротеиназ, коллагенов и цитокинов

в зависимости от срока инфекции [2]. Исследования дифференциальной экспрессии генов при трематодозах проводили ранее на различных организмах и на разных этапах развития технологий секвенирования и анализа транскриптомных данных, что делает сравнительный анализ практически невозможным.

Целью работы было определить видоспецифичные различия в экспрессии генов и активации сигнальных путей в печени хомячков *Mesocricetus auratus*, зараженных *O. viverrini*, *O. felineus* и *C. sinensis*, которые могут обуславливать разницу в канцерогенном потенциале исследуемых трематод.

Экспериментальная часть. Золотистые хомячки в возрасте 2-х месяцев были заражены метацеркариями, привезенными из эндемичных регионов: *O. viverrini* - из Таиланда, *C. sinensis* - из Кореи, *O. felineus* - из Новосибирска. Через 1 и 3 месяца после заражения забирали образцы печени и выделяли тотальную РНК с использованием TRI-Reagent (Sigma, USA). Библиотеки для секвенирования РНК из печени хомячков готовили в соответствии со стандартным протоколом New England Biolabs, который включал в себя выделение РНК необходимой длины из тотальной РНК, синтез и очистку кДНК, лигирование адаптеров и ПЦР амплификацию. Секвенирование 24 кДНК библиотек было проведено компанией Genewiz LLC (США) на платформе Illumina HiSeq 2500 методом парных прочтений 2 X 150 оснований. Биоинформатический анализ состоял из анализа дифференциальной экспрессии генов с помощью (R-пакет DESeq2), анализа функционального обогащения дифференциально экспрессирующихся генов по базам данных KEGG и MsigDB (R-пакеты clusterProfiler, org.Mm.eg.db, msigdb).

Результаты. В результате секвенирования библиотек было получено 905 079 329 последовательностей, из которых 86,8 % были уникально картированы на референсный геном золотистого хомячка BCM_Maur_2.0. Анализ дифференциально экспрессирующихся генов показал, что при инфекции *C. sinensis* изменялась экспрессия наибольшего количества генов: 3148 из 16768 генов (экспрессия меняется более чем в 2 раза и скорректированное значение $p < 0,05$): 1264 гена с пониженной экспрессией и 1884 гена с повышенной экспрессией. При инфекции *O. viverrini* значимо меняется экспрессия 1464 генов (593 генов с повышенной экспрессией, 871 ген с пониженной экспрессией), а при инфекции *O. felineus* - 1408 генов (779 генов с повышенной экспрессией, 629 генов с пониженной экспрессией). В результате анализа главных компонент была выявлена кластеризация образцов как по виду трематод, вызывающих инфекцию, так и по времени инфекции (Рис.1).

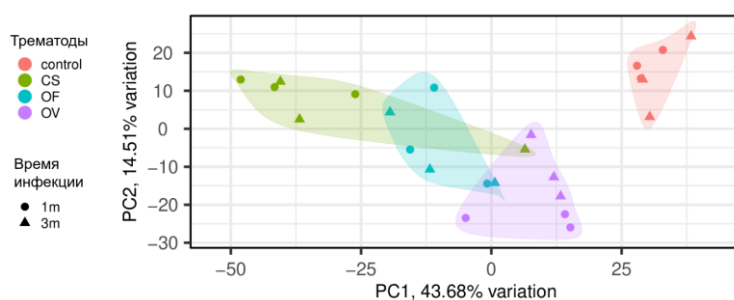


Рис.1. Результаты анализа главных компонент. Control - контроль, CS - *C. sinensis*, OF - *O. felineus*, OV - *O. viverrini*

С помощью анализа функционального обогащения дифференциально экспрессирующихся генов по базам данных KEGG и MSigDB были выявлены общие для трех видов инфекций клеточные пути, а также пути, уникальные для каждой инфекции. Значимо обогащенными путями при всех инфекциях были такие

пути, как IL2-STAT5, TNF- α NFKB, TGF- β , Hippo, MAPK, PI3K-Akt сигнальные пути и путь кальциевой сигнализации (Рис.2). При инфекции *C. sinensis* наблюдалось значимое обогащение по p53 сигнальному пути и сигнальному пути релаксина, при инфекции *O. viverrini* - по путям FoxO и гипоксии, а при инфекции *O. felineus* – по TNF- и ErbB сигнальным путям.

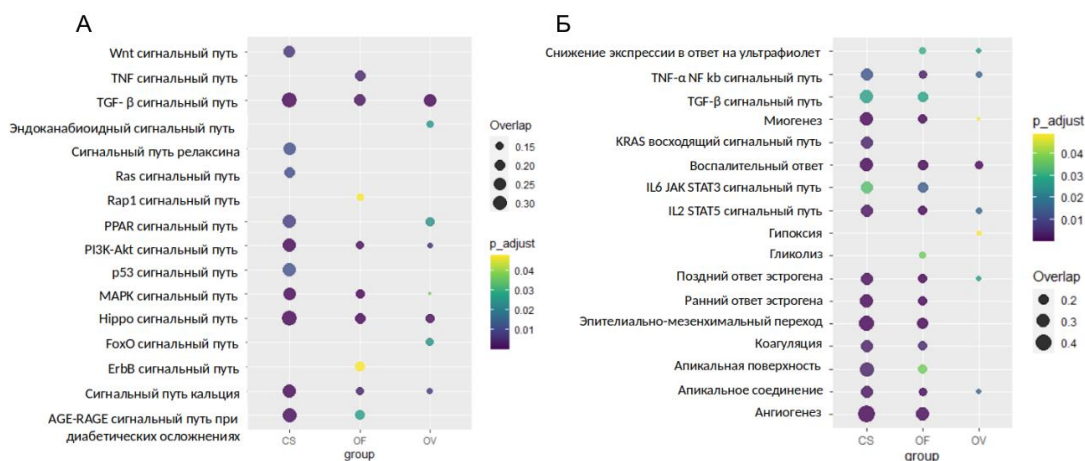


Рис.2. Точечная диаграмма обогащения путей: А - KEGG, Б - MSigDB. По оси X – виды трематод: CS – *C. sinensis*, OF- *O. felineus*, OV - *O. viverrini*. По оси Y - названия обогащенных путей. Размеры точек указывают на отношение генов пути в исследуемом транскриптом к генам пути в референсном геноме, а цвета точек отражают различные значения p_{adjust}

Кроме того, для всех инфекций было обнаружено обогащение дифференциально экспрессирующихся генов с пониженной экспрессией по путям, связанным с метаболизмом ксенобиотиков, желчных кислот, жирных кислот.

Заключение. Проведенное исследование позволяет сравнить изменения в экспрессии генов и активации клеточных и сигнальных путей, которые происходят во время инфекции тремя видами трематод семейства Opisthorchiidae. Наличие видоспецифичных различий позволяет предположить, что в основе схожей клинической картины инфекций могут лежать разные механизмы, опосредованные специфическими сигнальными путями. Снижение активности путей, связанных с метаболизмом, согласуется с опубликованными ранее результатами для других трематодозов [3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim D.M., Ko B.S., Ju J.W., et al. Gene expression profiling in mouse liver infected with *Clonorchis sinensis* metacercariae // *Parasitology research*. – 2009. – Vol. 106(1). – P. 269-278.
2. Loilome, W., Yongvanit, P., Wongkham, C., et al. Altered gene expression in *Opisthorchis viverrini*-associated cholangiocarcinoma in hamster model // *Molecular carcinogenesis*. – 2006. – Vol. 45(5). – P. 279-287.
3. Gobert G. N., Burke M. L., McManus D. P., et al. Transcriptional profiling of chronic clinical hepatic schistosomiasis japonica indicates reduced metabolism and immune responses // *Parasitology*. – 2015. – Vol. 142(12). – P. 1453-1468.

УДК 575.22

**ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНТОКСИЧНОСТИ ЭКСТРАКТА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ КУЛЬТУРЫ
КЛЕТОК КОПЕЕЧНИКА АЛЬПИЙСКОГО (*HEDYSARUM ALPINUM L.*)**В.А. Лобанова^{1,2}, М.В. ФилоноваНаучный руководитель: к.б.н. О.В. Неупокоева²¹НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга ТНИМЦ,
Россия, г. Томск, пр. Ленина 3, 634028²Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050E-mail: cheshir.11022002@gmail.com**STUDY OF GENOTOXICITY OF THE EXTRACT ISOLATED FROM THE CELL CULTURE
OF KOPEICHNIK ALPINE (*HEDYSARUM ALPINUM L.*)**V.A. Lobanova^{1,2}, M.V. Filonova

Scientific adviser: Ph.D., O.V. Neupokoeva

¹Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Russia, Tomsk, Lenin str., 3, 634028²Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050E-mail: cheshir.11022002@gmail.com

Abstract. *In this study, we evaluated the genotoxic properties of the extract of Alpine Kopeck (*Hedysarum alpinum L.*), obtained biotechnologically. The analysis of chromosomal aberrations in metaphysics in vivo was used, and the generally accepted and budget method of somatic recombination (mosaicism) in female fruit flies (SMART test) was also used. Based on the results obtained, it can be concluded that there are no genotoxic properties in the extract of the Alpine Kopeck with a single intragastric administration of the extract containing the amount at a dose of 40 mg / kg, as well as the course administration of the Alpine Kopeck to male and female mice of the NEA line for 5 days (40 mg / kg). An intelligent test also confirmed the absence of mutagenic properties in this extract.*

Введение. Известно, что природные соединения являются источником для разработки новых лекарственных средств. Их применение имеет ряд преимуществ по сравнению с синтетическими препаратами, они обладают низкой токсичностью, возможно их длительное использование как препаратов сопроводительной терапии или коррекции [1]. Важным условием использования как растительных, так и синтетических лекарственных средств является безопасность и схемы их применения, выбор доз. Проведение исследований генотоксичности является одним из первых и обязательных этапов доклинических испытаний [2]. Растения рода *Hedysarum* издавна применяются при заболеваниях вирусной природы. Их лечебные свойства обусловлены уникальным набором биологически активных веществ [3]. Одним таким представителем из данного семейства является Копеечник альпийский. Данный вид является многолетним травянистым растением, относящийся к евроазиатскому типу ареала. В исследовании использовали экстракт копеечника, который был получен на кафедре физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики БИ НИИ ТГУ. Экстракты,

полученные биотехнологическим способом, обладают рядом преимуществ.

Цель работы: исследовать генотоксичность экстракта, полученного из культуры клеток Копеечника альпийского.

Экспериментальная часть. В исследование включено 40 мышей линии СВА, одного возраста и массы. Животные были разделены на группы: 1-я группа - самцы (n=5) контроль для однократного введения; 2-я группа самцы (n=5) исследование терапевтической дозы Копеечника альпийского 40 мг/кг при однократном внутрижелудочном введении; 3-я группа - самцы (n=5), исследование воздействия максимальной дозы экстракта Копеечника Альпийского 200 мг/кг при однократном введении; 4-я и 5-я группы, самцы и самки (n=5), получавшие экстракт Копеечника альпийского 40 мг/кг курсом 5 дней; 6 и 7 группы - самцы и самки (n=5) контроль для 4 и 5 групп; 8 группа позитивный контроль – однократное введение циклофосфана (ЦФ) в дозе 20 мг/кг. ЦФ является классическим мутагеном и применяется в лабораторных исследованиях [4]. Контрольным животным в тех же условиях и объеме вводили крахмальную 1% взвесь. Эвтаназию животных производили методом цервикальной дислокации. Экстракт получен биотехнологическим методом. В результате фитохимического анализа в полученном извлечении из культуры копеечника были рассчитано количество флавоноидов – 4,18%, в пересчете на рутин, а также ксантонов – 7,45%, в пересчете на мангиферин. С помощью ГХ-МС было определено наличие следующих соединений - Пальмитиновая кислота, α -линолевая кислота, линоленовая кислота, формонетин (биочайнин Б), стигмастерол, стигмастан-3,5-диен. Препараты хромосом костного мозга (КМ) готовили по модифицированному методу Форда, окрашивали *азур II-эозином* в течение 40 минут. Забор биологического материала осуществляли через 24 часа после последнего введения экстракта. Анализу подвергались по 100 метафазных пластин КМ от одного животного (на группу 500). Статистический анализ, полученных данных проводили программой StatPlus Pro [Build 6.7.1.0.]. Использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (уровень значимости 5%). Общепринятым и бюджетным методом тестирования на мутагенность является метод соматической рекомбинации (мозаицизма) у самок *D. melanogaster* (SMART-тест) [4]. При этом маркерные рецессивные мутации родителей находятся в гомозиготном состоянии, родители имеют соответствующий фенотип – желтые самки (y) и кудрявые самцы (sn). При скрещивании таких особей появляется потомство, фенотипически не имеющее признаков рецессивных мутантных генов (серые самки с нормальными щетинками). Если добавление тестируемого вещества индуцирует нарушение структуры хромосом, то это ведет к фенотипическому изменению формы и цвета торакуса и щетинок у самок дрозофил [5]. Согласно методике, через 48 часов в питательную среду, добавляли исследуемый экстракт, в дозе 40 мг/кг. На 10-12 сутки просматривали вылупившихся самок в стереоскопический микроскоп. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью критерия χ^2 (хи- квадрат) с поправкой Йейтса, которая применяется только для таблиц 2×2. Для 5 % уровня значимости критическое значение χ^2 составляет 3,84 [4].

Результаты. У животных 2-й группы было выявлено 2,75±0,25 % aberrантных метафаз. Количество структурных изменений хромосом не превышает таковых в контрольной группе (1-я группа). У самцов, получавших экстракт в дозе 200 мг/кг, выявлено 3,80±0,37 % клеток с aberrациями хромосом. Количество структурных нарушений, среди которых одиночные фрагменты и гены, превышает показатели контрольной группы в 2 раза. Количество хромосом с aberrациями в 8-й группе (позитивный контроль) достигло 45,80±3,76 %. Количество структурных нарушений в этой группе значительно

превышало таковые 1-ой, 2-ой и 3-ей групп.

После курсового введения в течение 5 дней экстракта Копеечника альпийского в КМ самцов (4-й группа) выявлено $2,20 \pm 0,20$ % абберантных метафаз, у самок (5-я группа) аналогичный показатель составил $2,60 \pm 0,40$ %. Данные значения соответствуют уровню контрольной группы.

Исследование мутагенных свойств предполагает проведение как минимум двух тестов. В данном случае был проведён SMART-тест. В результате добавления экстракта копеечника в дозе 40 мг/кг в питательную среду, где уже находились личинки *D. melanogaster*, мутагенного эффекта не выявлено.

Заключение. В результате проведенного исследования получен не однозначный результат. При однократном внутрижелудочном введении экстракта Копеечника альпийского, в дозе 40 мг/кг, а также при курсовом 5-кратном (40 мг/кг) применении в группах самцов и самок мышей линии СВА генотоксических свойств не выявлено. При однократном внутрижелудочном введении самцам экстракт Копеечника альпийского в дозе 200 мг/кг индуцировал появление одиночных фрагментов хромосом и гепов в костном мозге. В тесте на дрозофиле не выявлено генотоксических эффектов. Требуется дальнейшее уточнение состава экстракта, проведение дополнительных методов исследования генотоксичности дозы 200 мг/кг. Кроме того, планируется изучить комутагенные эффекты - возможность лекарственной модификации генотоксичности других препаратов экстрактом Копеечника альпийского.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Самбухова Т.В. Овчинников Б.В. Ганапольский В.Л., и др. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* – 2017. – Т. 15., № 2. – С. 56-63.
2. Дурнев А.Д., Лапицкая А.С. Генотоксикология соединений растительного происхождения// *генетическая токсикология и генетически активные факторы среды.* – 2012. – Т. 10., № 3. – С. 41-52
3. Неретина О.В., Громова А.С., Луцкий В.И. Исследование химического состава копеечника щетинистого (*Hedysarum setigerum*) // *Химия и технология растительных веществ Материалы Всерос. Конф.* – 2002. – С. 62.
4. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica: книга для студентов, аспирантов и преподавателей медицинских колледжей и вузов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 379 с.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под общей редакцией Миронова А.Н. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

УДК 616.12-008.331.1:

МЕТАБОЛОМ МОЧИ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС ЛИНИИ НИСАГ

А.А. Малявко, Ю.К. Политыко, А.А. Серяпина

Научный руководитель: к.б.н., А.А. Серяпина

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10, 630090

E-mail: evanesalisa@yandex.ru

METABOLIC PROFILE OF URINE IN HYPERTENSIVE ISIAH RATS

A.A. Malyavko, Y.K., Polityko, A.A. Seryapina

Scientific Supervisor: PhD., A.A. Seryapina

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Russia, Novosibirsk, ak. Lavrentieva ave., 10, 630090

E-mail: evanesalisa@yandex.ru

Abstract. *A variety of causes and mechanisms of arterial hypertension pathogenesis requires differentiation of therapy and prevention of the disease. One of the methods to identify and comprehensively describe the specific pathogenic mechanisms is metabolomics. In our study, we studied the urine metabolome of ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension. WAG rats were chosen as normotensive controls. The aim of the experiment was to search for biochemical markers specific for the hypertensive status of ISIAH rats. Using the method of NMR spectroscopy, 64 metabolites were identified in the daily urine of experimental animals. Analysis of the data obtained showed that the hypertensive status of ISIAH rats is characterized by a decrease in the concentrations of citrate, acetoacetate, imidazole, nicotinamide, 1-methylnicotinamide, and valine in the urine. These results may be used in further studies on the search for biochemical markers of various forms of arterial hypertension.*

Введение. Артериальная гипертония – одно из самых распространенных заболеваний во всем мире, а также одна из основных причин смертности от сердечно-сосудистых патологий. Мультифакторность и полиморфность гипертонии, в частности, взаимодействие факторов «генотип-среда», приводит к необходимости поиска методов дифференцированной терапии и профилактики заболевания. Метаболомика – сравнительно молодой и перспективный аналитический подход, с помощью которого можно одновременно и с высокой точностью определить концентрации различных низкомолекулярных соединений, являющихся продуктами промежуточного и конечного обмена веществ в анализируемом образце. Идентификация характерных метаболомных профилей – информативный и при этом неинвазивный метод, который может позволить выявить болезнь на ранних этапах развития, охарактеризовать персональную картину патогенеза и в первую очередь защитить наиболее уязвимые органы-мишени. В настоящее время проведено некоторое количество метаболомных исследований различных гипертензивных состояний. Например, в исследовании с участием пациентов с эссенциальной артериальной гипертонией было обнаружено, что болезнь ассоциирована с метаболизмом аминокислот, стероидных гормонов, жирных кислот, а также с окислительным стрессом [1]. У крыс линии SHR со спонтанной гипертонией гипертензивный статус с возрастом вызывает развитие характерных осложнений, таких как сердечно-сосудистая, цереброваскулярная и почечная недостаточность [2].

В исследованиях метаболома крыс SHR было обнаружено снижение содержания промежуточных продуктов цикла Кребса на ранней стадии развития артериальной гипертензии, что свидетельствует о нарушении энергетического обмена [3]. В нашей работе в качестве объекта исследования была выбрана линия крыс НИСАГ, моделирующая влияние средовых факторов (психоэмоционального стресса) в сочетании с генетической предрасположенностью к развитию гипертензивного статуса [4].

Целью нашей работы являлась идентификация метаболомного состава мочи крыс линии НИСАГ и поиск возможных биохимических маркеров, характеризующих патогенез артериальной гипертензии в рамках исследуемой модели.

Экспериментальная часть. 10 самцов крыс линии НИСАГ с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией и 10 самцов крыс WAG (Wistar Albino Glaxo, нормотензивный контроль) содержались в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). АД у экспериментальных животных измеряли неинвазивно методом tail-cuff (БИОРАС, США). Для сбора образцов суточной мочи крыс помещали в индивидуальные метаболические клетки (Tecniplast, Италия). ЯМР-спектроскопия проводилась на базе Международного томографического центра СО РАН (Новосибирск, Россия). Статистическую обработку метаболомных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 12, с применением непараметрического метода оценки межгрупповых различий (U-критерий Манна-Уитни).

Результаты. Анализ данных, полученных с помощью ЯМР-спектроскопии, позволил определить концентрации 64 метаболитов в образцах суточной мочи крыс НИСАГ (АД = 205.6 ± 7.3 мм.рт.ст.) и WAG (АД = 136.6 ± 3.1 мм.рт.ст.). Статистический анализ показал достоверное понижение концентраций 29 метаболитов в моче крыс НИСАГ по сравнению с крысами WAG ($p < 0.05$). На рисунке 1 представлены межгрупповые различия в концентрациях тех метаболитов, которые, согласно литературным данным, ассоциированы с теми или иными механизмами развития гипертензии.

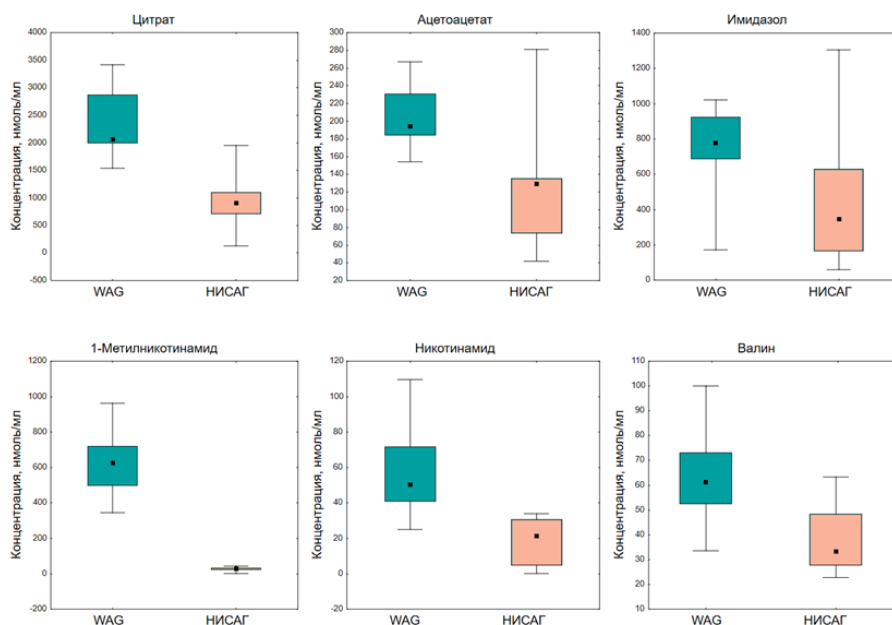


Рис. 1. Метаболиты, ассоциированные с развитием артериальной гипертензии у крыс НИСАГ

Заключение. Таким образом, гипертензивный статус крыс НИСАГ можно охарактеризовать снижением в суточной моче концентраций следующих метаболитов: имидазола, ассоциированного с

участием центральной нервной системы в регулировании АД [5]; ацетоацетата и цитрата, играющих важную роль в энергетическом балансе [6, 7]; никотинамида и его метаболита 1-метилникотинамида, которые являются предшественниками коферментов окислительно-восстановительных реакций – никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ) [8]; валина, выступающего в роли сигнальной молекулы в метаболизме глюкозы [9]. Эти данные могут свидетельствовать об энергетических перестройках и компенсаторных механизмах, возникающих в процессе развития стресс-зависимой артериальной гипертензии у крыс линии НИСАГ.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-20025) совместно с Министерством науки Новосибирской области (соглашение № 0000005406995998225120532 p-36 от 06.04.2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhao, H., Liu, Y., Li, Z., Song, Y., Cai, X., Liu, Y., et. al. Identification of essential hypertension biomarkers in human urine by non-targeted metabolomics based on UPLC-Q-TOF/MS // *Clinica Chimica Acta*. – 2018. – Vol. 486. – P. 192-198.
2. Lu Y, Jiye A, Wang G, Hao H, Huang Q, Yan B, Zha W, Gu S, et al. Gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry based metabonomic approach to differentiation hypertension- and age-related metabolic variation in spontaneously hypertensive rats // *Rapid Commun Mass Sp*. – 2008. – Vol. 22. – P. 7.
3. Akira K, Masu S, Imachi M, Mitome H, Hashimoto T. A metabonomic study of biochemical changes characteristic of genetically hypertensive rats based on H-1 NMR spectroscopic urinalysis. // *Hypertens Res*. – 2012. – Vol. 35., № 4 – P. 404-412.
4. Антонов Е.В., Александрович Ю.В., Серяпина А.А. и др. Стресс и артериальная гипертензия: крысы линии НИСАГ (ISIAH) // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2015. – Т. 19, № 4, – С. 455-459.
5. Schäfer S. G., Kaan E. C., Christen M. O., Löw-Kröger A., Mest H. J., Molderings G. J. Why imidazoline receptor modulator in the treatment of hypertension? // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1995. – Vol.763. – P. 659-672.
6. Hamm LL. Renal handling of citrate. // *Kidney Int*. – 1990 – Vol.38., № 4. – P. 728-735.
7. Kolb, H., Kempf, K., Röhlings, M., Lenzen-Schulte, M., Schloot, N. C., Martin, S. Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. // *BMC medicine*. – 2021 – Vol.19., № 1. – P. 313.
8. Hoshino J., Schlüter U., Kröger, H. Nicotinamide methylation and its relation to NAD synthesis in rat liver tissue culture. Biochemical basis for the physiological activities of 1-methylnicotinamide // *Biochimica et biophysica acta*. – 1984. – Vol. 801., № 2. –250-258.
9. Yoon M.S. The emerging role of branched-chain amino acids in insulin resistance and metabolism. // *Nutrients*. – 2016 – Vol.8., № 7. – P. 405.

УДК 57.085.23

**IN VITRO EVALUATION OF THE BIOLOGICAL EFFECTS OF *JUNIPERUS PSEUDOSABINA*,
TAXUS CUSPIDATA AND *LARIX GMELINII***

G.M. Medetova, A.E. Mudrikova, E.G. Shapovalova

Scientific Supervisor: PhD., E.G. Shapovalova

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: medetovagm@mail.ru**IN VITRO ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ *JUNIPERUS PSEUDOSABINA*,
TAXUS CUSPIDATA И *LARIX GMELINII***

Г.М. Медетова, А.Е. Мудрикова, Е.Г. Шаповалова

Научный руководитель: к.т.н., Е.Г. Шаповалова

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: medetovagm@mail.ru

Аннотация. В данной работе исследованы экстракты *Juniperus pseudosabina*, *Taxus cuspidata*, *Larix gmelinii*, выделенные методом сверхкритической флюидной экстракции. Была оценена жизнеспособность и воспалительная реакция клеток. Установлено, что через 6 дней количество клеток в присутствии образцов остается примерно таким же, как и в контроле. Результаты ИФА показали, что экстракты не вызывают значительной продукции цитокинов.

Introduction. Extracts based on coniferous plants are used as plant raw materials for antitumor, immunomodulatory drugs, as well as food additives [1]. The biological activity of extracts based on coniferous plants *Juniperus pseudosabina*, *Taxus cuspidata*, *Larix gmelinii* were studied in this work. *Larix gmelinii* exhibits antimicrobial and antioxidant properties [2]. Yew needle juice exhibits antimicrobial activity [3]. *Juniperus* species exhibits hypoglycaemic, antidiabetic, antifungal, diuretic, antiseptic properties [4]. At present, the state of knowledge about the properties and uses of the components of coniferous plants is incomplete. Coniferous plants are a promising plant raw material not only for medicinal, but also for dietary and functional supplements.

Research methods. The method of supercritical extraction was used to obtain a series of solutions of extracts with a concentration of 5; 25; 50 mg/ml. Samples were labeled as follows: J5, J25, J50 (*Juniperus pseudosabina* (5;25;50 mg/ml), L5, L25, L50 (*Larix gmelinii* (5;25;50 mg/ml)), T5, T25, T50 (*Taxus cuspidata* (5;25;50 mg/ml)). Extractions were carried out at 400 bar pressure and at an extraction temperature of 55 to 60 °C. Monocytes were isolated from the human leucothrombo layer by double magnetic separation [5]. Cells seeded on plastic were used as controls. Cells were incubated at 37 °C and 7,5 % CO₂ for 6 days. The viability of mononuclear cells was assessed using the resazurin test. The effect on monocyte activation was studied by enzyme immunoassay (ELISA) for the following parameters: TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8.

Results. For the study of immunomodulatory properties based on the results of the assessment of cytotoxicity, the following SFE extracts were selected: J5, L25, L5, T50, T25, T5. Cells cultured on plastic without samples were used as a positive control. To take into account the effect of the solvent, we used cells cultured with

the addition of a solvent. Assessment of metabolic activity showed that after 6 days the number of cells in the presence of samples remains approximately the same as control (Fig. 1).

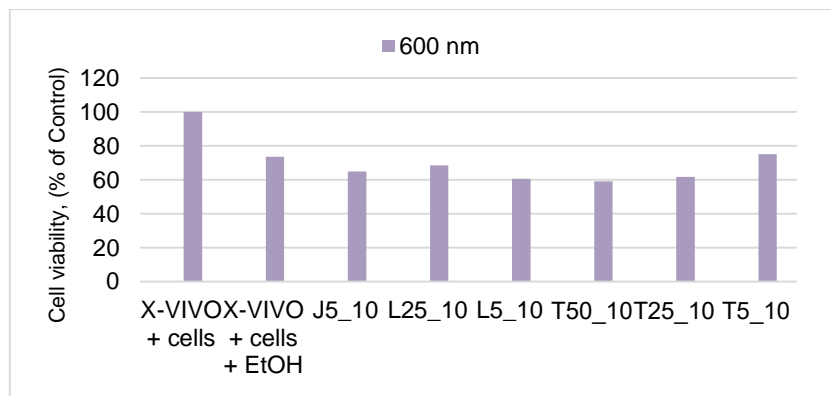


Fig. 1. of *Juniperus pseudosabina* (M5), *Larix gmelinii* (J5, J25), *Taxus cuspidata* (T5, T25, T50) extracts

To study the immunomodulatory properties, the key cytokines M1 of macrophages were selected: IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α (Fig. 2). IL-8 has important role in chemotaxis and pro-inflammation by stimulating neutrophils. The level of TNF- α activity was the lowest among other cytokines. L25 demonstrated the highest level of TNF- α activity. IL-8 activity level was equable and low for all samples. Concentration of IL-6 was also in approximately the same level for all samples. IL-1 β one of the first is activated in the protective response of the body under the action of pathogenic factors. Concentration of IL-1 β was the highest among other samples.

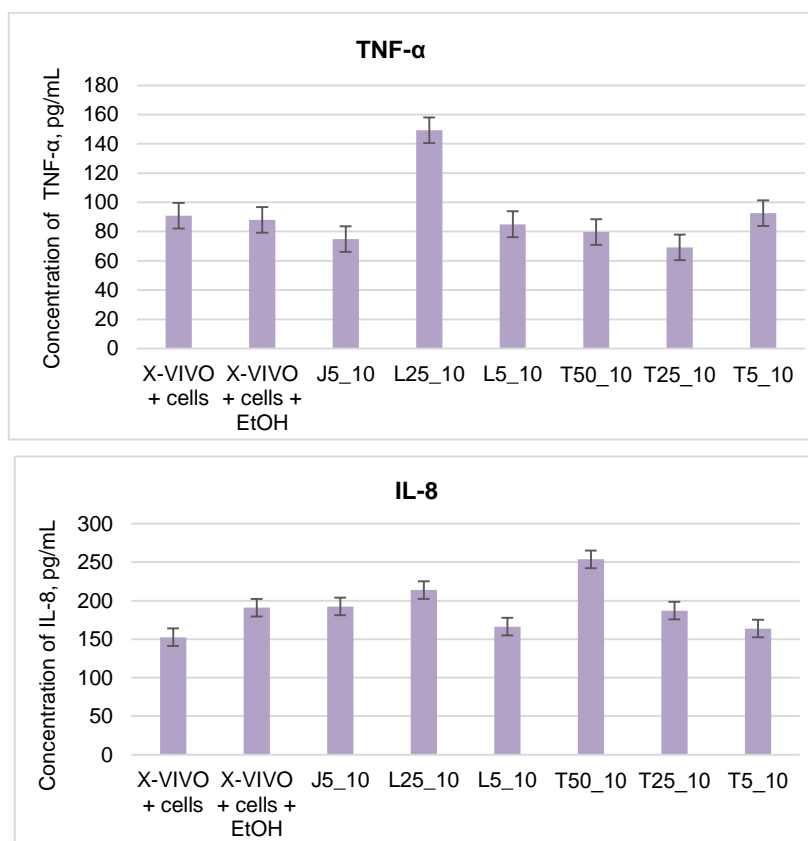


Fig. 2. Concentration of cytokines

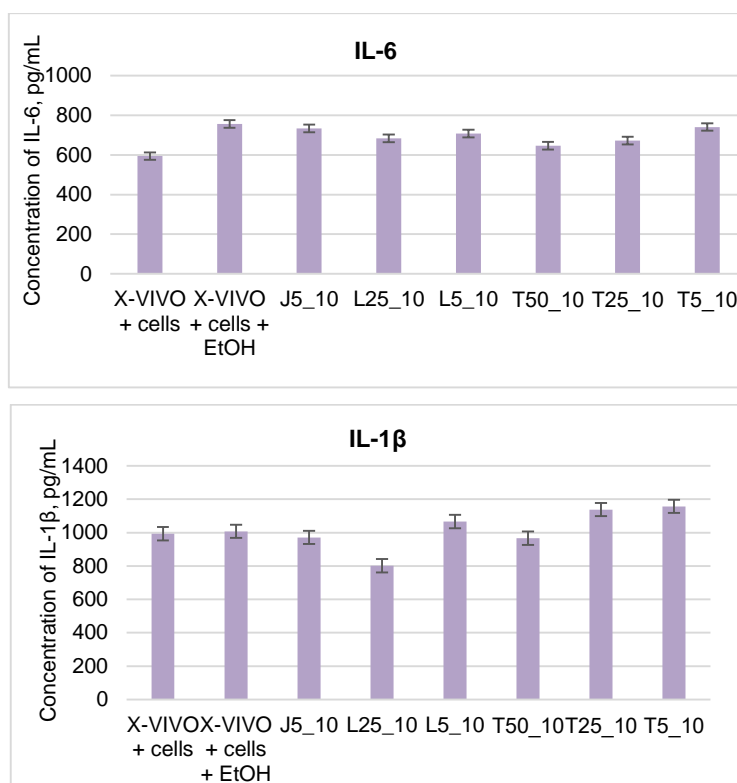


Fig. 2. Concentration of cytokines (continuation)

Conclusion. Extracts of coniferous plants *Juniperus pseudosabina*, *Taxus cuspidata* and *Larix gmelinii* obtained by supercritical extraction do not affect the viability of macrophages from individual human donors. Also, the extracts do not cause a pro-inflammatory reaction. The studied coniferous extracts will allow the development and production of new dietary supplements, functional nutrition and medicines based on natural plant materials.

The work was carried out within the framework of the project part of state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of Russia in the field of scientific activity (project №FSWM-2021-0007).

REFERENCES

1. Ling X., Bochu W. (2014). A review of phytotherapy of gout: perspective of new pharmacological treatments. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, V. 69, no. 4, pp. 243-256.
2. Li X. et al. (2017). Antimicrobial activity and mechanism of Larch bark procyanidins against *Staphylococcus aureus*. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. V. 49, no. 12, pp. 1058-1066.
3. Kobayashi J., Shigemori H. (2002). Bioactive taxoids from the Japanese yew *Taxus cuspidata* // *Medicinal research reviews*. V. 22, no. 3, pp. 305-328.
4. Swanston-Flatt S. K. et al. (1990). Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice // *Diabetologia*. V. 33, pp. 462-464.
5. Popova A., Kzhyshkowska J., Nurgazieva D. et al. (2011). Pro- and anti-inflammatory control of M-CSF-mediated macrophage differentiation. *Immunobiology*, V. 216, Iss. 1-2, pp. 164-172.

УДК 618.19-006.6-056.7:575.224

**НОВАЯ ГЕРМИНАЛЬНАЯ МУТАЦИЯ ГЕНА BRCA2 У МОЛОДОЙ ПАЦИЕНТКИ
ТУВИНСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ДИАГНОЗОМ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

А.Ю. Молоков^{1,2}, Г.А. Кононова²

Научный руководитель: к.м.н., П.А. Гервас^{1,2}

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

²НИИ онкологии, Томский национальный медицинский центр,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

E-mail: amolokov@inbox.ru

**NEW GERMLINE MUTATION OF THE BRCA2 GENE IN A YOUNG BREAST CANCER PATIENT
OF TUVAN ORIGIN**

A.Yu. Molokov^{1,2}, G.A. Kononova²

Scientific Supervisor: PhD., P.A. Gervas^{1,2}

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

² Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kooperativniy lane, 5, 634009

E-mail: amolokov@inbox.ru

Abstract. *It is known that 10-15 percent of breast cancer patients have hereditary breast/ovarian cancer syndromes. The main purpose of the study was to identify molecular changes associated with hereditary BC in Russian Mongoloid BC patients (Tuvans). Twenty-six patients were included in the study. Genomic DNA extracted from lymphocytes was used to prepare DNA-libraries. High-throughput sequencing was used to identify ethnospecific mutations associated with breast cancer. Paired-end sequencing (2×150 bp) was conducted on a NextSeq 500 system (Illumina, USA). For the first time, a new germline mutation associated with breast cancer in the BRCA2 gene (c.7410_7411delCA) was identified in a young Tuvan BC patient.*

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) является ведущей онкологической патологией у женского населения Российской Федерации. Известно, что в 5-10% случаев РМЖ обусловлен наследственным синдромом РМЖ и накоплением в семьях мутаций генов BRCA1 и BRCA2, фатально увеличивающих риск возникновения данной патологии до 85-100%. Обнаружено, что относительно небольшие, биологически изолированные народности характеризуются выраженным эффектом предшественника (founder effect) - преобладанием повторяющихся мутаций в BRCA1 и BRCA2 генах. Для России выявлена founder мутация BRCA1 5382insC, которая составляет до 90% всех мутаций гена BRCA1 у пациенток славянского происхождения, проживающих в достаточно отдалённых друг от друга регионах России [1, 2]. На практике наличие мутаций BRCA1/2 дает возможность прогнозировать эффективность различных режимов химиотерапии и определять прогноз заболевания.

Указанные достижения молекулярной онкологии в лечении наследственных форм РМЖ остаются на сегодняшний день недоступными для коренного населения Сибирского и Дальневосточного федеральных округов, представленных многочисленными этническими группами, для которых

проводятся исследования по поиску мутаций, ответственных за наследственные раки. Таким образом, нами проведено исследование с целью выявления мутаций, ассоциированных с наследственным синдромом РМЖ в этнических группах Сибири и Дальнего Востока (Тувинки), что позволит выявить маркеры формирования групп повышенного онкологического риска, профилактики, ранней диагностики и прогноза адекватной терапии заболевания.

Целью данной работы являлся поиск этноспецифических мутаций, ассоциированных с наследственными формами рака молочной железы (РМЖ) у коренного населения Сибири (Тувинки).

Экспериментальная часть. Для проведения высокопроизводительного секвенирования была сформирована группа из 40 пациенток с диагнозом РМЖ, в возрасте от 25 и до 65 лет, средний возраст $45 \pm 8,85$. Все пациентки по происхождению относятся к тувинской этнической группе. Пациенты были отобраны по двум критериям, ранний возраст заболевания и/или отягощенный онкологический анамнез. У 22,5% (9 из 40) пациенток в возрасте до 50 лет онкологический анамнез не отягощен, у 47,5% (19 из 40) отсутствуют данные об онкологическом анамнезе и у 20% (8 из 40) онкологический анамнез отягощен. ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови. Подготовка библиотек проводилась с использованием набора Hereditary Cancer Solution™ (SOPHiA GENETICS). Секвенирование выполнялось на платформе NextSeq500 (Illumina, США).

Результаты. По результатам биоинформатического анализа данных NGS у пациентки с диагнозом рак молочной железы, 42 года на момент постановки диагноза, была обнаружена новая герминальная мутация гена BRCA2. У пациентки 1948 года рождения, получавшей лечение в Тувинском Республиканском онкологическом диспансере, поставлен диагноз метакронный рак молочной железы (поражение молочных желез было выявлено в 1990 и в 2007 годах). Семейный анамнез у пациентки отягощен: у отца – рак пищевода, бабушка и тетя – рак желудка.

По результатам биоинформатического анализа данных NGS у данной пациентки не было обнаружено ранее описанных патогенных мутаций генов BRCA1/2, но была обнаружена новая герминальная мутация гена BRCA2, не описанная в базах данных. Новая герминальная мутация гена BRCA2 приводит к делеции двух нуклеотидов CA (Цитозин-Аденин) в 14 экзоне и приводит к сдвигу рамки считывания (g.39790_39791delCA, c.7410_7411delCA, p.T2471Kfs*3 (GRCh37, hg19)) (Рис. 1).



Рис. 1. Визуализация местоположения новой мутации (NM_00059: exon14: c.7610_7611delCA: p.T2471Kfs*3) в гене BRCA2 с помощью программы ProteinPaint (GRCh37, hg19) [3]

Мы проверили данную мутацию с помощью предикторных программ, которые предсказали возможно повреждающее действие данной мутации на белок (MutationTaster: disease causing, SIFT:

damaging, CAPICE = 0.999) [4-6]. Делеция пары Цитозин-Аденин приводит через 3 триплета к возникновению стоп-кодона (Опал), что останавливает синтез белка и приводит к потере 947 аминокислот.

Данная мутация, приводящая к возникновению стоп-кодона, может нарушать взаимодействие с белками RAD51, CDK1, CDK2, CHEK1 и CHEK2, а также приводит к нонсенс-опосредованному распаду, что приведет к потере данной копии гена BRCA2. Все вышесказанное создает предпосылки, что новая герминальная мутация c.7410_7411delCA в гене BRCA2 у молодой пациентки (тувинка) с отягощенным семейным анамнезом, в дальнейшем может быть мутацией выбора для подтверждения ее патогенности в исследовании *in vitro* и с помощью технологии мини-ген.

Заключение. Таким образом, нами впервые обнаружена новая герминальная мутация c.7410_7411delCA гена BRCA2 у молодой пациентки тувинского происхождения с отягощенным семейным анамнезом.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 23-25-00386).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Любченко Л.Н. Наследственный рак молочной железы и/или яичников: ДНК-диагностика, индивидуальный прогноз, лечение и профилактика: Автореф. Дис. докт.мед.наук. – Москва, 2009. – 295 с.
2. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. – 2010. – Т. 11., №4. – С. 258 – 266.
3. Zhou X., Edmonson M.N., Wilkinson M.R., Patel A., Wu G., Liu Y., Li Y., Zhang Z., Rusch M.C., Parker M., Becksfort J., Downing J.R., Zhang J. (2016) Exploring genomic alteration in pediatric cancer using ProteinPaint // Nat Genet, no. 48, pp. 4-6.
4. Steinhaus R., Proft S., Schuelke M., Cooper D.N., Schwarz J.M., Seelow D. (2020) MutationTaster // Nucleic Acids Research, no. 49, pp. W446–W451.
5. Ng P.C., Henikoff S. (2001) Predicting deleterious amino acid substitutions [Electronic version]. Genome Res, no. 11, pp. 863-874.
6. Li S., van der Velde K.J., de Ridder D., van Dijk A.D.J., Soudis D., Zwerwer L.R., Deelen P., Hendriksen D., Charbon B., van Gijn M.E., Abbott K., Sikkema-Raddatz B., van Diemen C.C., Kerstjens-Frederikse W.S., Sinke R.J., Swertz M.A. (2020) CAPICE: a computational method for Consequence-Agnostic Pathogenicity Interpretation of Clinical Exome variations // Genome Med, no 12, pp. 75.

УДК 616-092.18

**ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ CD-МАРКЕРОВ КЛЕТКАМИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ
(CD3, CD36, CD68) ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ**И.А. Осихов

Научный руководитель: доцент, д.м.н., О.В. Воронкова
Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050
E-mail: osikhov.25-88@yandex.ru

**EVALUATION OF CD MARKER EXPRESSION BY ADIPOSE TISSUE CELLS
(CD3, CD36, CD68) IN METABOLIC SYNDROME**I.A. Osikhov

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., Dr., O.V. Voronkova
Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovsky trakt, 2, 634050
E-mail: osikhov.25-88@yandex.ru

Abstract. *Visceral adipose tissue is involved in the pathogenesis of metabolic syndrome, which serves not only as a "depot" of energy reserves, but also secretes many active molecules: adipokines, cytokines, and chemokines. The metabolic syndrome symptom complex is characterized by increased proliferation, hypertrophy of adipocytes, as well as infiltration by macrophages, neutrophils, and lymphocytes into this endocrine organ. The cells of the stromal-vascular fraction contained in adipose tissue, resident and recruited immune cells have powerful secretory activity. Inflammatory mediators produced in adipose tissue penetrate the peripheral blood circulation and contribute to the development of subclinical chronic systemic inflammation. That is why, from this point of view, visceral obesity can be considered an inflammatory chronic process.*

Введение. Очень часто во многих исследованиях прикладного и фундаментального характера представлено так называемое метаболическое (вялотекущее) воспаление с хроническим долгим течением и различным исходом, и прогнозом. Само же воспаление может быть причиной глубоких изменений и достаточно сильных нарушений в морфологии и функционировании висцеральной жировой ткани (ВЖТ) на уровне липидного и углеводного метаболизма, охватывая все её структурные и функциональные звенья [1, 2]. Происходящий системный воспалительный процесс характеризуется не только хорошо заметными повреждениями обменов в клетках ВЖТ, но и в том числе изменением всех сигнальных путей метаболической активной ткани [3-5]. При воспалении с вялотекущим характером происходит постепенное проникновение клеток иммунной системы, что является важным параметром особой реакции самого органа [6]. При развивающемся адаптивном иммунитете селективно привлекаются к участию иммунокомпетентные клетки, которые несут на себе особые рецепторные (CD-маркеры) к различным антигенам. Стоит отметить, что изучение профиля класса дифференцировки клеток ВЖТ на текущее время является актуальной задачей для полного понимания патогенеза воспаления при абдоминальном ожирении в жировой ткани [7].

Экспериментальная часть. Для подробного изучения все обследуемые лица ($n = 22$) были разделены на две группы. Основную группу сформировали пациенты с выраженными признаками МС ($n = 16$). Группу сравнения составили здоровые лица без признаков МС ($n = 6$). ВЖТ забирали из большого сальника пациентов в начале плановой эндоскопической холецистэктомии, проводимой в срок и строго по всем назначенным медицинским показаниям. Из небольшого участка ВЖТ в объеме 1 см^3 экстрагировали клеточную взвесь адипоцитов и стромальных элементов для дальнейшего исследования и описания. Оценка клеточной экспрессии CD-маркеров (CD3, CD36, CD68) в ВЖТ проводили методом иммуногистохимии, а дополнительно оценку экспрессии для CD36 – методом проточной цитофлуориметрии. Все результаты исследования были статистически проанализированы с применением пакета программ STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc., USA). Количественные данные были показаны в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей – Me (LQ; UQ). Проверка нормальности распределения была проведена методом Шапиро-Уилка. При отсутствии нормального распределения при сравнении средних групповых количественных признаков был применен тест Манна-Уитни (U-тест). Для оценки статистической взаимосвязи между показателями считали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r).

Результаты. Особенности экспрессии CD-маркеров клетками ВЖТ представлены в таблице 1 и на рисунках 1, 2 и 3.

Таблица 1

Экспрессия CD-маркеров клетками жировой ткани у больных с метаболическим синдромом и его отсутствием по данным иммуногистохимии Me (LQ; UQ)

Показатели, условные единицы	Обследованные лица		p
	без МС (n = 6)	с МС (n = 16)	
CD3	0,03 (1,15;3,90)	2,90 (1,90;6,20)	>0,05
CD36	25,9 (19,5;34,1)	23,1 (20,6;25,3)	>0,05
CD68	0,15 (0;0,50)	0,70 (0;1,40)	<0,05

Примечание: p – статистическая значимость межгрупповых различий.

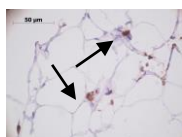


Рис. 1. Белая жировая ткань сальника у больной Л.

Стрелками указаны CD3-позитивные клетки.

Иммунопероксидазный метод. Окраска – диаминобензидин, гематоксилин

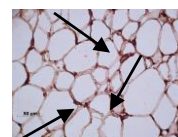


Рис. 2. Белая жировая ткань сальника у больной Д.

Стрелками указаны CD36-позитивные клетки.

Иммунопероксидазный метод. Окраска – диаминобензидин, гематоксилин



Рис. 3. Белая жировая ткань сальника у больной И. Стрелками указаны CD68-позитивные клетки.

Иммунопероксидазный метод. Окраска – диаминобензидин, гематоксилин

В настоящем исследовании было показано, что клеточные линии ВЖТ в разной степени могут синтезировать на поверхностных структурах свой CD36 маркер в обеих группах исследования: пациенты с признаками МС и группа сравнения. Выявилась особенность в увеличении удельного веса CD36+ стромальными клетками у пациентов с МС при сопоставлении с лицами без признаков МС. Проведенный анализ имеющихся и выявленных корреляций показал, что при выполненной морфометрии ВЖТ, участки активного эндокринологического органа представлены в виде увеличенного объема с повышенной плотностью, а также были они выстроены CD3+ лимфоцитами и CD36+ и CD68+ макрофагами. Стоит отметить, что с уровнем избыточного отложения жировых прослоек, статистически значимая положительная взаимосвязь обнаружилась только с клеточным показателем CD68+ в ВЖТ: с массой тела ($r = 0,342$, $p < 0,05$) и с объемом подкожной жировой ткани ($r = 0,355$, $p < 0,05$).

Заключение. Особенности коммуникации между клетками – это один из важных и главных элементов в регулировании активности и функции ВЖТ [7, 4, 5]. В развитии воспалительного процесса в жировой ткани наблюдаются свои отличительные черты при работе и функционировании клеток в виде высокого уровня активности сигнальных систем (рецепторы, элементы сигнал-передающих путей и эффекторные белки) [3, 6]. Одним из представлений в осуществлении клеточной сигнализации можно описать как особый вид связи, при реализации которой играют роль специальные молекулы – кластеры дифференцировки (CD-маркеры) на поверхностях клеточных структур. При этом в большинстве случаев важное прогностическое значение при МС показала величина по образованию маркера CD68 у макрофагов. Данный параметр можно рассматривать и рекомендовать как критерий значимости молекулярного маркера при воспалительном процессе ВЖТ с точки зрения диагностического подхода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Романцова Т.И., Сыч Ю.П. Иммунометаболизм и метавоспаление при ожирении // Ожирение и метаболизм. – 2019. – Т. 16., № 4. – С. 3-17.
2. La Cava A. Leptin in inflammation and autoimmunity // Cytokine. – 2017. – Vol. 98. – P. 51-58.
3. Ригер Н.А., Апрытин С.А., Шипелин В.А., Гмошинский И.В. Иммунологические маркеры алиментарно-индуцированной гиперлипидемии у крыс линии Вистар // Вопросы питания. – 2019. – Т. 88., № 3. – С. 44-52.
4. Chahirou Y., Mesfioui A., Ouichou A., Hessni A. Адипокины: механизмы метаболических и поведенческих расстройств // Ожирение и метаболизм. – 2018. – Т. 15., № 3. – С. 14-20.
5. Hsu PS, Lin CM, Chang JF, et al. Participation of NADPH Oxidase-Related Reactive Oxygen Species in Leptin-Promoted Pulmonary Inflammation: Regulation of cPLA2 α and COX-2 Expression // Int J Mol Sci. – 2019. – Vol. 20., № 5. – P. 1-15.
6. Laakso M, Kuusisto J, Stancakova A, et al. The Metabolic Syndrome in Men study: a resource for studies of metabolic and cardiovascular diseases // J Lipid Res. – 2017. – Vol. 58., № 3. – P. 481-493.
7. Шварц В. Воспаление жировой ткани (часть 1). Морфологические и функциональные проявления // Проблемы эндокринологии. – 2009. – Т. 55., № 4. – С. 44-49.

УДК 576.535

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ OPISTHORCHIS FELINEUS НА КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ
ЧЕЛОВЕКА: ХОЛАНГИОЦИТЫ H69 И ПЕРВИЧНЫЕ ЭНДОТЕЛИОЦИТЫ**

Д.В Пономарев

Научный руководитель: д.б.н., М.Ю. Пахарукова

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, 630090

E-mail: p.dmitr@outlook.com

**THE EFFECT OF OPISTHORCHIS FELINEUS ON HUMAN CELLS: H69 CHOLANGIOCYTES AND
PRIMARY ENDOTHELIOCYTES**

D.V. Ponomarev

Scientific Supervisor: Dr., M. Pakharukova

Institute of Cytology & Genetics SB RAS, Russia, Novosibirsk, Lavrentiev ave., 10, 630090

E-mail: p.dmitr@outlook.com

Abstract. *Opisthorchis felineus is a food-borne liver trematode and the main cause of opisthorchiasis in Russia and Europe. Opisthorchiasis affects hepatobiliary system of fish-eating mammals, including humans. Opisthorchiasis is associated with biliary epithelium proliferation and epithelial neoplasia. Secreted proteins and extracellular vesicles of liver flukes might play an important role in the pathology development. The effect of parasitic excretory-secretory products on human cholangiocytes H69 and hepatoma HepG2 cells was assessed. High cell-migratory activity of fluke extracellular vesicles was demonstrated. The activity was specific for cholangiocytes, but not HepG2 cells. The excretory-secretory product and extracellular vesicles induced the tube formation of HUVEC cells. Specific effect of liver fluke extracellular vesicles on migration rate of human cholangiocytes in vitro may reflect the mechanisms of development of precancerous biliary intraepithelial neoplasia during opisthorchiasis in vivo.*

Введение. Описторхоз – заболевание из группы трематодозов, вызываемое гельминтами *Opisthorchis felineus*, которые паразитируют в гепатобилиарной системе млекопитающих, включая человека. При описторхозе происходит усиленная пролиферация клеток эпителия желчных протоков, а также неоплазия эпителия желчных протоков [1], что расценивается как предраковое состояние. Механизмы развития неоплазии эпителия не исследованы. Считается, что механическое повреждение эпителия желчных протоков, действие экскреторно-секреторного продукта паразита, внеклеточные везикулы, входящие в его состав и вызываемые ими воспалительные реакции, являются основными факторами развития неоплазии эпителия желчного протока. Внеклеточные везикулы [2], выделяемые в межклеточное пространство клетками различных тканей и органов, содержат белки, РНК и липиды. Функции экзосом разнообразны: межклеточная коммуникация, участие в секреции белков, модулирование иммунного ответа [3]. Вероятно, экзосомы описторха могут способствовать развитию осложнений описторхоза, однако в литературе мало сведений о составе и свойствах секреторного продукта *O. felineus* и его влиянии на клетки человека. Результаты исследований влияния секрета

описторха на функциональную активность эндотелиоцитов HUVEC и скорость клеточной миграции эпителиоцитов человека H69 могут послужить основой для выявления ключевых компонентов канцерогенного потенциала *O. felineus*. Пересмотр канцерогенной безвредности этого паразита может помочь ранней диагностике холангиокарциномы на начальных этапах, что поможет значительно улучшить прогноз заболевания. Идентификация и функциональный анализ свойств компонентов секретома описторха перспективны с позиции обнаружения новых «эволюционно оптимизированных» соединений-кандидатов, обладающих митогенными и репаративными свойствами.

Экспериментальная часть. Исследование проводили на перевиваемой культуре холангиоцитов человека H69 и на первичной культуре клеток эндотелия пупочной вены человека HUVEC. Клеточная линия холангиоцитов H69 представляет собой SV40-трансформированную линию холангиоцитов человека, которые были выделены в ходе трансплантации печени. В качестве специфического контроля были взяты клетки гепатомы HepG2. Взрослых гельминтов выделяли из желчных протоков печени хомячков *Mesocricetus auratus*, инфицированных метацеркариями *O. felineus*.

Скорость клеточной миграции оценивали при помощи скрэтч-теста. Ангиогенез эндотелиоцитов HUVEC оценивали при помощи теста на образование капилляро-подобных структур. Предварительно охлажденный гель добавляли в 96-луночный планшет, клетки HUVEC высевали на гель и культивировали с экскреторно-секреторным продуктом и внеклеточными везикулами *O. felineus* в течение 4 часов при 37 °C с 5 % CO₂. Образованную капилляро-подобную сеть фотографировали при помощи светового инвертированного микроскопа. Анализ полученных изображений проводился с использованием пакета расширения «Анализатор ангиогенеза» для ImageJ.

Экскреторно-секреторный продукт и его фракции получали при помощи метода мембранной ультрафильтрации сред, в которых культивировали взрослых особей *O. felineus*.

Результаты, полученные в ходе эксперимента, были анализированы с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0. и Microsoft Excel. В ходе анализа полученных данных определяли средние арифметические значения (M), среднеквадратичное отклонение (SD). Для оценки статистических различий между выборками использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости p-value менее 0,05.

Результаты. После со-культивирования клеток H69F1 с шестью взрослыми особями *O. felineus* было показано увеличение скорости миграции до 4 раз ($p < 0,01$). В отличие от холангиоцитов, изменения скорости миграции клеток HepG2 как при со-культивировании с взрослыми особями *O. felineus* обнаружено не было. После культивирования с фракциями экскреторно-секреторного продукта *O. felineus* (включая внеклеточные везикулы) скорость миграции клеток H69 была увеличена в 2–3 раза ($p < 0,01$), и в 6 раз на клетках H69 в обедненной сывороткой среде ($p < 0,05$). При добавлении ингибитора EGFR, эффект на скорость клеточной миграции клеток H69 отсутствовал. В отличие от клеток H69, эффект на миграцию клеток HepG2 не наблюдался.

При оценке влияния *O. felineus* на функциональную активность эндотелиоцитов HUVEC было обнаружено, что в присутствии экскреторно-секреторного продукта и внеклеточных везикул *O. felineus* стимулировалось формирование капилляро-подобной сети. Количество и площадь ячеек образованной сети было увеличено более чем в 2 раза ($p < 0,05$). Количество основных сегментов сети было увеличено в 2 раза ($p < 0,05$), а их общая длина выросла на 52 % ($p < 0,05$). При этом, количество и длина

изолированных сегментов, характерных для несформированных капилляро-подобных сетей, была снижена более чем на 60 % ($p < 0,05$).

Заключение. Ранее было показано, что хроническое течение описторхоза сопровождается развитием неоплазии эпителия желчных протоков, что считается предраковым состоянием. С целью изучения механизмов, лежащих в основе этих предраковых изменений, в нашей работе впервые было продемонстрировано, что выделяемый при со-культивировании экскреторно-секреторный продукт *O. felineus*, и его фракции, в условиях низкого содержания сыворотки, вызывают увеличение скорости миграции холангиоцитов человека H69F1. При этом увеличение скорости миграции происходит, по-видимому, через EGFR-зависимый путь. Эффект на холангиоциты является специфичным, поскольку экскреторно-секреторный продукт *O. felineus* не оказывает достоверного влияния на клетки гепатомы печени HepG2. Кроме того, было продемонстрировано, что экскреторно-секреторный продукт и внеклеточные везикулы *O. felineus* повышают функциональную активность эндотелиоцитов пупочной вены человека. Внеклеточные везикулы *O. felineus* могут содержать в своем составе ростовые факторы, которые оказывают специфический эффект на клетки эпителия желчных протоков, стимулируют ангиогенез и, вероятно, обуславливают неоплазию и гиперплазию эпителия желчных протоков при хроническом описторхозе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pakharukova M.Y., Mordvinov V.A. The liver fluke *Opisthorchis felineus*: biology, epidemiology and carcinogenic potential // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2016. – Vol. 110., № 1. – P. 28-36.
2. Van der Pol E., Böing A.N., Harrison P., et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles // Pharmacol Review. – 2012. – Vol. 64., № 3. – P. 676-705.
3. Rana S., Zöller M. Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: a hypothesis // Biochem Soc Trans. – 2011. – Vol. 39., № 2. – P. 559-562.

УДК 615.076.7

ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО ПЕПТИДА, МЕЧЕНОГО РАДИОНУКЛИДОМ ЛЮТЕЦИЕМ-177, В КУЛЬТУРЕ ПСМА-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РАКОВЫХ КЛЕТОКА.А. Прач¹, Ф.Ш. Юладшева¹, Г.Е. Янович²

Научный руководитель: доцент, к.х.н., Е.В. Плотников

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050²Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050

E-mail: nastya.prach@mail.ru

STUDY OF A NEW LUTETIUM-177-LABELED PEPTIDE IN THE CULTURE OF PSMA-EXPRESSING CANCER CELLSA.A. Prach¹, F.S. Yuldasheva¹, G.E. Janovich²

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., PhD., E.V. Plotnikov

¹Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050²Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow trakt str., 2, 634050

E-mail: nastya.prach@mail.ru

Abstract. *In the present study, we developed a method for obtaining a conjugate labeled with the therapeutic radionuclide lutetium-177. It was evaluated the specificity of binding and in vitro internalization of a radiopharmaceutical based on the original PSMA-targeted ligand molecule.*

Введение. Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее часто диагностируемых злокачественных новообразований у мужчин. При этом ежегодно регистрируется 1,3 миллиона случаев заболевания во всем мире [1]. Однако, большинство опухолей в конечном итоге перерастают в метастатический резистентный к кастрации рак предстательной железы, который является последней стадией в РПЖ и основной причиной смерти [2].

Простатспецифический мембранный антиген (ПСМА) сверхэкспрессируется в 90 % случаев метастатического рака предстательной железы [3], при этом имеет небольшое содержание в нормальных тканях (почки, тонкий кишечник, слюнные и слезные железы). Этот факт превращает ПСМА в высокоспецифичный биомаркер РПЖ. Разработка и оптимизация новых молекул-лигандов, нацеленных на ПСМА с оптимальными для диагностики и терапии характеристиками, является актуальной темой для исследования.

Таким образом, целью данной работы является разработка методики получения и оценка специфичности связывания и интернализации *in vitro* радиокомплекса на основе оригинальной молекулы-лиганда, нацеленной на ПСМА для лечения рака предстательной железы.

Экспериментальная часть. Для мечения ¹⁷⁷Lu лиганд (PS-212) растворяли в смеси воды и 20 % диметилсульфоксида (ДМСО) до концентрации 1 нмоль/мкл. К 1-10 нмоль PS-212 добавляли буфер ацетата аммония (50-150 мкл, 0,2 М, pH 5,5) с последующим добавлением раствора ¹⁷⁷LuCl₃ (5 мкл, 25 МБк). Реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин при 85 °С.

Для исследования специфичности связывания использовались две клеточные линии: экспрессирующие и не экспрессирующие ПСМА рецептор. Культуру РПЖ не экспрессирующую ПСМА - РС3 (ATCC; LGC Promochem, Бурос, Швеция) культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, пенициллина 100 МЕ/мл и 100 мкг/мл стрептомицина при 37 °С и в атмосфере 5 % CO₂. Гиперэкспрессирующий вариант клеточной линии РС3 – РС3-rip, был культивирован в двух типах среды RPMI: 1) 20 % эмбриональной бычьей сыворотки, 1 % L-глутамина и 1 % PEST (пенициллин и стрептомицин); 2) 20 % эмбриональной бычьей сыворотки, 1 % L-глутамина и 1 % PEST и 10 мкг/мл пиромидина. Вторую среду использовали каждый второй пассаж для поддержания селекции клонов. Для типичного эксперимента клетки высевали за сутки до эксперимента в чашки Петри в количестве 1×10⁶ клеток/чашку.

Специфичность *in vitro* тестировали методом насыщения. Перед экспериментом старую среду удаляли и клетки промывали 1 мл раствора PBS. В 6-луночный планшет с клетками добавляли немеченный PSMA-617 (100 нМ) и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. После этого во все чашки с клетками добавляли меченный конъюгат до концентрации 1 нМ и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После одночасовой инкубации клетки промывали 1 мл раствора PBS, открепляли 0,5 мл трипсина и собирали.

Для исследования интернализации PS-212 с радиоактивной меткой клетки РС3-rip и РС3 клетки инкубировали с 1 нМ исследуемым веществом в среде RPMI при 37 °С (5 % CO₂) и в заданные часовые точки (1, 2, 4, 6 и 24 ч) собирали среду и клетки промывали раствором фосфатного буфера (PBS). Клетки обрабатывали 1 мл 4 М раствора мочевины в 0,2 М глициновом буфере, рН 2,5, в течение 5 минут на льду. После этого собирали кислые фракции в пробирки и дважды промывали клетки PBS. Для лизиса клеток добавляли 1 мл 1 М раствора гидроксида натрия, инкубировали при 37 °С не менее 30 мин, соскребали клетки с чашки и собирали, промывали 1 мл и собирали в основную фракцию.

Радиохимический выход (РХВ) и радиохимическую чистоту (РХЧ) оценивали тонкослойной радио-хроматографией на ТСХ-сканере (ELYSIA Raytest. Model: Gamma BGO-V, Detector +miniGita, Германия) в среде 0,2 М лимонной кислоты. Для измерения активности использовался автоматизированный гамма-счетчик с NaI(Tl) детектором (2480 Wizard, PerkinElmer, США).

Результаты. РХВ (рис. 1) и РХЧ образца молекулы-лиганда к ПСМА PS-212, меченного ¹⁷⁷Lu составили 100%. Дополнительная очистка меченного конъюгата не требуется.

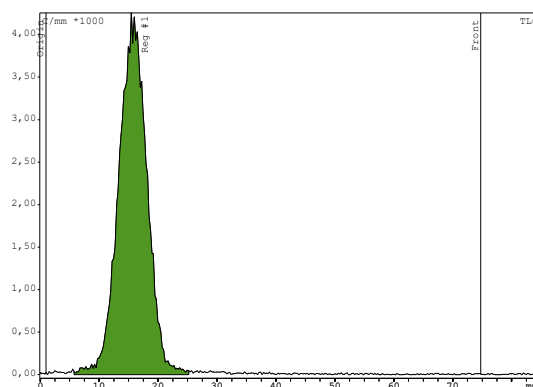


Рис. 1. Радиохроматограмма конъюгата ¹⁷⁷Lu-PS-212

Результаты определения специфичности связывания *in vitro* показаны на рисунке 2. Связывание с ПСМА-экспрессирующими клетками РС-3 было значительно ниже ($p < 5 \times 10^{-5}$) после насыщения рецепторов ПСМА в заблокированных группах, связывания с клетками РС-3 не было обнаружено, что указывает на то, что связывание было ПСМА-опосредованным.

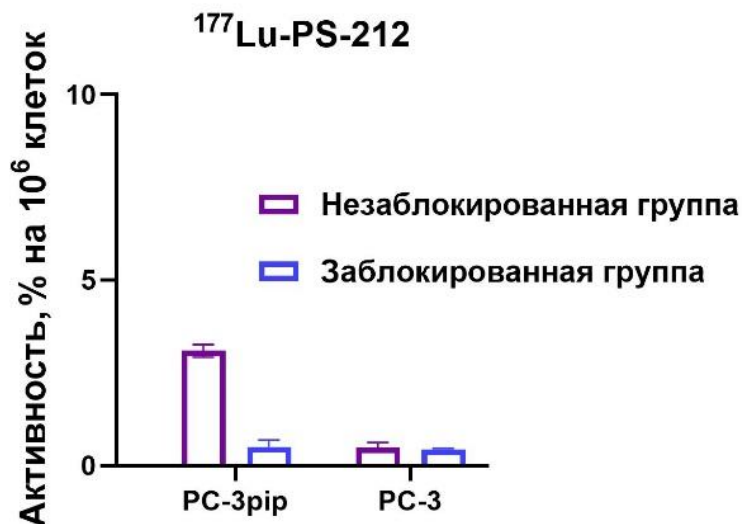


Рис. 2. Специфичность связывания ¹⁷⁷Lu-PS-212 с ПСМА-экспрессирующими клетками рака предстательной железы PC-3rip и неэкспрессирующими ПСМА рецептор клетками PC-3.

Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение для трех образцов

По результатам клеточного процессинга радиоактивность кислой фракции считается активностью, связанной с мембраной, основной фракции – интернализованной активностью. Интернализованная фракция составила 26 % от общей клеточно-ассоциированной активности через 24 часа. Ассоциированная с клеткой активность и интернализованная активность увеличивались со временем, при этом были достаточно медленными.

Заключение. Таким образом, связывание *in vitro* ¹⁷⁷Lu-PS-212 с ПСМА-экспрессирующими клетками PC-3rip было насыщаемым, т.е. специфичным. Эти результаты дают основу для дальнейших исследований *in vivo* с целью изучения биораспределения меченого конъюгата в мышинных моделях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giraudet L., Kryza D., Hofman M., Moreau A., Fizazi K., Flechon A., Hicks R.J., Tran B. PSMA targeting in metastatic castration-resistant prostate cancer: where are we and where are we going? // *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. – 2021. – V. 13. – P. 1-14.
2. Wang F., Li Z., Feng X., Yang D., Lin M. Advances in PSMA-targeted therapy for prostate cancer // *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. – 2022. – V. 25., №. 1. – P. 11-26.
3. Paschalis A., Sheehan B., Riisnaes R., Rodrigues D.N., Gurel B., Bertan C., Johann .S. de Bono. Prostate-specific membrane antigen heterogeneity and DNA repair defects in prostate cancer // *Eur Urol*. – 2019. – V. 76. – P. 469-478.

УДК 577.29

**АНАЛИЗ ГЕННОГО ПРОФИЛЯ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ
РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ РАКА IN VITRO**

М.А. Ракина^{1,2}, Т.С. Сударских¹, И.В. Ларионова^{1,2}

Научный руководитель: профессор, д.б.н., Ю.Г. Кжышковска

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

²НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

E-mail: militsarakina@mail.ru

**ANALYSIS OF THE GENE PROFILE OF TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES IN VARIOUS
CANCER TYPES IN VITRO**

M.A. Rakina¹, T. S. Sudarskih, I.V. Larionova^{1,2}

Scientific Supervisor: Prof., Dr., J. G. Kzhyszkowska¹

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

²Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634009

E-mail: militsarakina@mail.ru

Abstract. *Tumor-associated macrophages (TAM) are key cells of innate immune system and tumor microenvironment where they constitute up to 50% of cells and play a crucial role in tumor progression [1]. Generally, TAMs are divided into anti-inflammatory antitumor M1 polarization and pro-inflammatory pro-tumor M2 polarization [2]. Despite the generally accepted classification, TAMs are highly heterogeneous cells, and their variability is highly dependent on cancer type, stage, and intratumoral heterogeneity. Thus, we studied gene expression profile of monocyte-derived TAMs cultured with condition medium from tumor cells of breast, colorectal, lung, prostate, and ovarian cancer types to analyze transcriptional biomarkers associated with the pro-and antitumor activity of TAMs.*

Введение. Опухлеассоциированные макрофаги (ОАМ) являются ключевыми клетками врожденной иммунной системы и опухолевого микроокружения (ОМ), где они составляют до 50 % клеток и включаются в поддержку опухоли на всех этапах ее развития – рост, ангиогенез, инвазия и метастазирование, колонизация, рецидивирование и ответ на терапию [1]. Макрофаги делятся на классически активированные, противовоспалительные или противоопухолевые М1 макрофаги, и альтернативно активированные, провоспалительные или проопухолевые М2 макрофаги [2]. Поляризация макрофагов может быть вызвана различными стимулами из ОМ, включая факторы роста, цитокины, хемокины, компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ). В различных типах рака, таких как рак легкого, молочной железы, яичников, колоректальный рак и другие, ОАМ были ассоциированы с плохим прогнозом исхода заболевания. Было показано, что М2 макрофаги способствуют выживанию опухолевых клеток, пролиферации, ангиогенезу и метастазированию, тогда как М1 макрофаги, наоборот, способствуют процессу апоптоза. Несмотря на общепринятую классификацию, ОАМ являются

высокопластичными клетками, и их вариабельность сильно зависит от типа рака, его стадии и внутриопухолевой гетерогенности [3]. В настоящем исследовании был проведен анализ генного профиля макрофагов, стимулированных супернатантами опухолевых клеток линий рака молочной железы, простаты, яичников, легкого и колоректального рака, в модельной системе *in vitro*, для анализа транскрипционных биомаркеров, связанных с про и противоопухолевой активностью ОАМ.

Экспериментальная часть. Для исследования использовали следующие линии опухолевых клеток: MCF7 (аденокарцинома молочной железы, подтип LumA), BT474 (аденокарцинома молочной железы, подтип LumB), MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы, трижды негативный рак), SKBR-3 (аденокарцинома молочной железы, HER2+), SW837 (аденокарцинома прямой кишки), SKOV3 (серозная цистаденокарцинома яичников), PC-3 (аденокарцинома предстательной железы) и A549 (аденокарцинома легкого). Клетки MCF-7, MDA-MB-231 и A549 культивировали в среде DMEM с 10 % FCS и 1 % антибиотика; Клетки BT474, SKBR-3, SKOV3, PC-3 культивировали в среде RPMI1640 с 10 % FCS и 1 % антибиотика; Клетки SW837 культивировали в среде Лейбовица с 10 % FCS и 1 % антибиотика. Супернатанты опухолевых клеток собирали после 3 пассажей и замораживали при -80°C до стимуляции свежевыделенных моноцитов. Моноциты выделяли из лейкоцитомоноцитарного слоя крови доноров с помощью градиента плотности на фиколле и CD14-позитивной селекции.

Модельную систему ОАМ получали путем стимуляции первичных моноцитов человека цитокинами (M-CSF 10 нг/мл, IL-4 10 нг/мл и дексаметазон 10^{-8}) и супернатантами опухолевых клеток. Моноциты культивировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл. К свежевыделенным моноцитам добавляли супернатанты опухолевых клеток в количестве 20% от общего объема среды. В качестве контроля моноциты инкубировали с 20% культуральной среды клеточной линии (DMEM, Leibovitz или RPMI), что было необходимо для проверки влияния факторов опухолевых клеток, а не самой среды, на профиль ОАМ. Клетки культивировали в течение 6 дней при 37°C , а затем собирали для выделения РНК и дальнейшего синтеза кДНК и постановки ПЦР.

С помощью ПЦР был проведен анализ экспрессия генов, функционально характеризующих про- и противоопухолевую поляризацию ОАМ: IL-1 β , IL-8, CD206, CD163, MARCO, CCL2, SPP1, SPARC, S100A4, IL-10, STAB1, YKL-39, YKL-40, VEGFA, SOCS-3.

Результаты. При культивировании моноцитов с супернатантами опухолевых клеток наблюдалось повышение экспрессии для различных генов по сравнению с моноцитами, культивированными в чистой среде: при культивировании с супернатантом MDA-MB-231 – IL-10 ($0,52 \pm 0,45$ vs. $1,36 \pm 0,43$, $p=0,032$), YKL-39 ($0,28 \pm 0,29$ vs. $1,50 \pm 0,75$, $p=0,016$), CCL2 ($0,89 \pm 0,86$ vs. $8,54 \pm 4,30$, $p=0,016$), CXCL8 ($0,35 \pm 0,14$ vs. $2,38 \pm 1,20$, $p=0,016$), IL-1b ($0,19 \pm 0,09$ vs. $2,53 \pm 1,12$, $p=0,016$). В случае с культивированием с супернатантом клеток линии BT-474 – STAB1 ($0,99 \pm 0,52$ vs. $3,78 \pm 2,17$, $p=0,032$), CXCL8 ($0,52 \pm 0,45$ vs. $1,36 \pm 0,43$, $p=0,032$), IL-1b ($0,32 \pm 0,29$ vs. $1,06 \pm 0,25$, $p=0,016$), MARCO ($0,62 \pm 0,14$ vs. $1,39 \pm 0,68$, $p=0,008$). При стимуляции SKBR-3 – STAB1 ($0,99 \pm 0,52$ vs. $3,78 \pm 2,67$, $p=0,032$), CD163 ($1,26 \pm 0,37$ vs. $2,50 \pm 1,70$, $p=0,032$), CXCL8 ($0,28 \pm 0,13$ vs. $2,07 \pm 2,62$, $p=0,008$). Добавление супернатанта SW-837 приводило к повышению экспрессии VEGFA ($0,39 \pm 0,15$ vs. $1,82 \pm 1,20$, $p=0,008$) и CXCL8 ($0,32 \pm 0,20$ vs. $1,59 \pm 0,91$, $p=0,008$). Добавление супернатанта PC-3 – STAB1 ($0,99 \pm 0,52$ vs. $3,56 \pm 2,51$, $p=0,032$), CCL2 ($1,56 \pm 1,49$ vs. $10,59 \pm 5,93$, $p=0,016$), CD163 ($1,26 \pm 0,38$ vs. $2,88 \pm 1,54$, $p=0,016$), CD206 ($1,49 \pm 0,91$ vs. $3,85 \pm 1,22$, $p=0,032$), CXCL8 ($0,28 \pm 0,13$ vs. $2,58 \pm 2,11$, $p=0,008$), IL-1b ($0,32 \pm 0,29$ vs. $1,48 \pm 1,45$, $p=0,032$),

MARCO ($0,62 \pm 0,14$ vs. $1,61 \pm 1,07$, $p=0,032$). При культивировании с супернатантами клеток SKOV-3 и A-549 повышенная экспрессия наблюдалась только в генах CXCL8 ($0,28 \pm 0,13$ vs. $0,92 \pm 0,46$, $p=0,032$) и CCL2 ($0,89 \pm 0,86$ vs. $10,55 \pm 7,56$, $p=0,016$), соответственно.

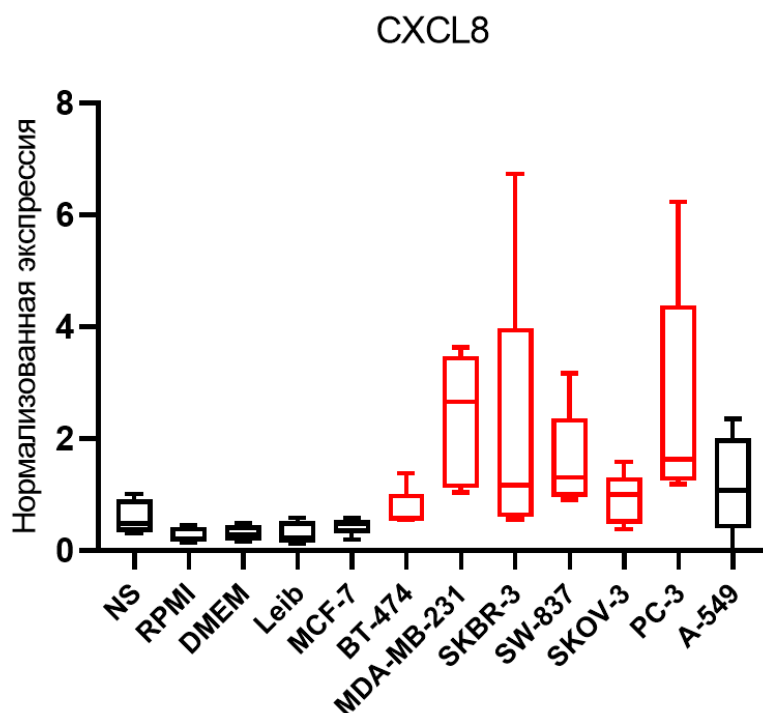


Рис. 1. Результаты ПЦР анализа экспрессии CXCL8 в моноцитах доноров, стимулированных супернатантами опухолевых клеток

Заключение. В результате исследования были обнаружены опухолеспецифические различия в транскриптомном профиле ОАМ различных типов рака in vitro.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1073 на тему: «Генетическое и эпигенетическое редактирование клеток опухоли и микроокружения с целью блокировки метастазирования»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malekghasemi S. et al. Tumor-Associated Macrophages: Protumoral Macrophages in Inflammatory Tumor Microenvironment // Advanced Pharmaceutical Bulletin. – 2020. – V. 10., № 4. – P. 556-565.
2. Munir M.T. et al. Tumor-Associated Macrophages as Multifaceted Regulators of Breast Tumor Growth // International Journal of Molecular Science. – 2021. – V. 22., № 12. – P. 6526.
3. Vitale I. et al. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment // Cell Metabolism. – 2019. – V. 30., № 1. – P. 36-50.

УДК 612.176.2 : 612.391.4

**ОСОБЕННОСТИ ВАРИАбельНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА У ЖЕНЩИН
С РАССТРОЙСТВАМИ ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ**Е.И. Ромашко

Научный руководитель: профессор, д.б.н., О.В. Филатова

Алтайский государственный университет,

Россия, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, 656049

E-mail: baklanova.0209@mail.ru**FEATURES OF HEART RATE VARIABILITY IN WOMEN WITH EATING DISORDERS**E.I. Romashko

Scientific Supervisor: Prof., Dr., O.V. Filatova

Altai State University, Russia, Barnaul, Lenin ave., 61, 656049

E-mail: baklanova.0209@mail.ru

Abstract. *Sympathoadrenal and vagoinular reactions to hunger and to food intake are of particular interest in terms of studying the pathogenesis of eating disorders, and consequently, for developing effective approaches to combating overeating and for selecting adequate diet therapy. The aim of the study was to study the features of heart rate variability in women with eating disorders. A cross-sectional study of 100 mature-aged women (II period) living on the territory of Barnaul was conducted. The Dutch DEBQ questionnaire was used to study the types of eating behavior. Heart rate variability (HRV) was analyzed. According to the results of the Dutch questionnaire of eating behavior, 5 groups of women with different types of eating behavior were identified. Indicators characterizing the activity of the parasympathetic nervous system, RMSSD, pNN50 %, HF tended to decrease in women with a violation of PP in restrictive and emotionogenic types and with a combination of violations of three types of PP at a statistically significant level. Conclusions. Certain types of PP in women are associated with the dominance of different departments of the ANS. In women with a restrictive type of PP violation, with an emotionogenic type of PP violation, and also in women with a combination of three types of PP violation, a weakening of parasympathetic effects on the heart rhythm is shown.*

Введение. Анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР) – это современная методология исследования и оценки состояния регуляторных систем организма, в частности, автономной нервной системы (АНС), а также контроля за уровнем стресса [1]. Особый интерес вызывает роль АНС в формировании адекватного пищевого поведения и поддержании массы тела. Через АНС и соответствующие нейрогуморальные пути осуществляется контроль за использованием и потреблением энергии [цит. по: 4], результатом чего является пищевое поведение (ПП) с высокодифференцированными эмоционально-поведенческими и гуморально-вегетативными реакциями как на голод, так и на поступление пищи в организм. При этом работ, посвященных роли АНС в регуляции ПП в норме и у лиц с избыточной массой тела и ожирением, крайне мало, и зачастую они носят противоречивый характер [2-4]. В то же время симпатоадреналовые и вагоинсулярные реакции на голод и на прием пищи представляют особый интерес в плане изучения патогенеза нарушений пищевого поведения [3], а,

следовательно, и для разработки эффективных подходов к борьбе с переизбытком и для подбора адекватной диетотерапии.

Цель исследования, изучить особенности вариабельности сердечного ритма у женщин с расстройствами пищевого поведения.

Экспериментальная часть. Проведено поперечное исследование 100 лиц женского пола зрелого возраста (II периода), проживающих на территории г. Барнаула. Средний возраст составил $44,6 \pm 0,75$ лет. Для исследования типов пищевого поведения использовали Голландский опросник DEBQ. Анализ вариабельности ритма сердца (BPC) проводили с использованием электрокардиографа «Поли-спектр-8\EX» с применением программного обеспечения фирмы «Нейрософт» (г. Иваново, РФ). В состоянии покоя, в положении лежа на спине, при спокойном дыхании и отсутствии воздействия внешних раздражителей испытуемым обрабатывали спиртом места наложения электродов, затем наносили проводниковую пасту и производили регистрацию ЭКГ-сигнала в одном из стандартных отведений на коротких 5-минутных промежутках. Регистрировались ритм сердца ЧСС (уд./мин). Определяли временные показатели: SDNN – среднееквадратичное отклонение интервалов R-R, RMSSD – среднееквадратичное отклонение межинтервальных различий; pNN50 % – долю смежных интервалов, отличающихся более чем на 50 мс. Проводился анализ с вычислением спектра мощности колебаний в трех частотных диапазонах: 0,004-0,08 Гц (очень низкие частоты – VLF); 0,09-0,16 Гц (низкие частоты – LF); 0,17-0,5 Гц (высокие частоты – HF). При спектральном анализе оценивали VLF – абсолютную (m^2) и относительную (%) мощность волн в диапазоне очень низких частот, LF – абсолютную (m^2) и относительную (%) мощность волн в диапазоне низких частот, HF – абсолютную (m^2) и относительную (%) мощность волн в диапазоне высоких частот, TP – общую мощность спектра. Статистическую обработку проводили с использованием компьютерной программы SPSS v 21.0.

Результаты. По результатам голландского опросника пищевого поведения женщины были разделены на 5 групп: 1 группа – женщины без нарушений пищевого поведения (16 %); 2 группа – женщины с нарушением пищевого поведения по эмоциогенному типу (22 %); 3 группа – женщины с нарушением пищевого поведения по ограничительному типу (9 %); 4 группа – женщины с сочетанием нарушения пищевого поведения по эмоциогенному и ограничительному типу (43 %); 5 группа – женщины с сочетанием нарушения трех типов ПП (10 %). Среди всех испытуемых наиболее часто выявляется сочетание нарушения эмоциогенного и ограничительного типов пищевого поведения (43 %). Состояние автономной нервной системы (АНС) оценивали на основании временных и спектральных показателей анализа BPC. Показатели, характеризующие активность парасимпатического отдела нервной системы, RMSSD, pNN50 %, HF имели тенденцию к снижению у женщин с нарушением ПП по ограничительному типу (RMSSD – Me28,0, Q_{25-75} –14,0-42,5; pNN50 % – Me1,2, Q_{25-75} –0,30-3,30; HF – Me305,0, Q_{25-75} –87,5-629,5), с нарушением ПП по эмоциогенному типу (RMSSD – Me33,5, Q_{25-75} –29,0-40,5; pNN50 % – Me11,9, Q_{25-75} –3,30-19,85; HF – Me379,0, Q_{25-75} –262,5-518,75) и также у женщин с сочетанием трех типов ПП (RMSSD – Me21,5, Q_{25-75} –17,50-48,75; pNN50 % – Me3,1, Q_{25-75} –0,30-26,73; HF – Me225,0, Q_{25-75} –133,25-943,0) на статистически значимом уровне ($p_{1-3}=0,04$; $p_{1-3}=0,027$, $p_{2-3}=0,006$, $p_{3-4}=0,003$; $p_{1-2}=0,041$, $p_{1-3}=0,036$, $p_{3-4}=0,042$). Женщины с нарушением пищевого поведения по ограничительному типу имеют статистически значимо более высокий показатель ЧСС (уд/мин) по сравнению с другими группами (1 группа – Me66,3, Q_{25-75} –66,0-79,88, 2 группа – Me67,4, Q_{25-75} –64,63-72,25, 4 группа – Me67,0, Q_{25-75} –8,82, 5 группа – Me69,7,

Q₂₅₋₇₅ – 6,20). Женщины с нарушением ПП по эмоциогенному типу (RMSSD – Me33,5, Q₂₅₋₇₅–29,0–40,5; pNN50 % – Me11,9, Q₂₅₋₇₅–3,30–19,85; HF – Me379,0, Q₂₅₋₇₅–262,5–518,75) и женщины с сочетанием нарушения ПП по эмоциогенному и ограничительному типу (RMSSD – Me41,0, Q₂₅₋₇₅ – 31,0–52,0; pNN50 % – Me12,3, Q₂₅₋₇₅–2,7–30,8; HF – Me657,0, Q₂₅₋₇₅–328,0–1389,0), имели более высокие показатели мощности спектра в области очень низких частот VLF (мс²) по сравнению с другими группами (1 группа – RMSSD – Me40,5, Q₂₅₋₇₅ – 29,75; pNN50 % – Me8,1, Q₂₅₋₇₅–2,68–32,18; HF – Me714,0, Q₂₅₋₇₅–306,75–9859,75; 3 группа – RMSSD – Me28,0, Q₂₅₋₇₅–14,0–42,5; pNN50 % – Me1,2, Q₂₅₋₇₅–0,30–3,30; HF – Me305,0, Q₂₅₋₇₅–87,5–629,5; 5 группа – RMSSD – Me21,5, Q₂₅₋₇₅–17,50–48,75; pNN50 % – Me3,1, Q₂₅₋₇₅–0,30–26,73; HF – Me225,0, Q₂₅₋₇₅–133,25–943,0;). По мнению А.Н. Флейшмана [5] мощность VLF-колебаний ВСП является чувствительным индикатором управления метаболическими процессами и хорошо отражает энергодефицитные состояния. Высокий по сравнению с нормой уровень VLF можно трактовать как гипердаптивное состояние, сниженный уровень VLF указывает на энергодефицитное состояние. Увеличение мощности волн в диапазоне очень низких частот VLF (мс²) в группах женщин с нарушением ПП по эмоциогенному типу и женщин с сочетанием нарушения ПП по эмоциогенному и ограничительному типу отражает напряжение со стороны энергетических и метаболических процессов. У обследованных нами женщин выявленные нарушения ПП ассоциированы с особенностями вегетативной регуляции, так, при нарушениях ПП по эмоциогенному и ограничительному типам доминирует активность симпатической нервной системы. Полученные результаты позволяют говорить о том, что доминирование разных отделов автономной нервной системы через нейрогуморальные и метаболические уровни регуляции способствуют формированию и закреплению нарушений ПП, определяя таким образом поведенческий контур энергетического обмена.

Заключение. Определенные типы ПП у женщин ассоциированы с доминированием разных отделов АНС. У женщин с нарушением ПП по ограничительному типу, с нарушением ПП по эмоциогенному типу и также у женщин с сочетанием нарушения трех типов ПП показано ослабление парасимпатических влияний на ритм сердца.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берсенева Е.Ю., Суворов А.В., Семенов Ю.Н., Гуров А.А., Баевский Р.М. Новые приборы для анализа вариабельности сердечного ритма в космической медицине и перспективы их использования в клинической медицине и в прикладной физиологии // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова с международным участием (18–22 сентября 2017 г., Воронеж). – М.: Изд-во Истоки, 2017. – С. 2424–2426.
2. Аверьянов А.П. Вегетативный гомеостаз и особенности адаптации у детей с ожирением // Проблемы эндокринологии. – 2006. – №52 (6). – С. 21–26.
3. Вейн А.М., Вознесенская Т.Г. Вегетативные расстройства: клиника, лечение, диагностика. – М.: МИА, 2000. – 752 с.
4. Мохова И.Г., Пинхасов Б.Б., Селятицкая В.Г. Оценка вариабельности сердечного ритма во взаимосвязи с нарушениями пищевого поведения у женщин с разными типами ожирения и сахарным диабетом 2 типа // Сибирский научный медицинский журнал. – 2018. – №3. – С. 43–48.
5. Флейшман А.Н. Медленные колебания гемодинамики. – Новосибирск, 1999. – 264 с.

УДК: 616.98:616.831-002]:579.834.114:616.155.3-076

**АНАЛИЗ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАЗЛИЧНЫМИ КЛЕЩЕВЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ**

К.В. Самойлов, А.В. Семенова, О.В. Ямпольская

Научные руководители: доцент, д.м.н., О.В. Воронкова

Сибирский государственный медицинский университет,

Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050

E-mail: samoilov.krl@gmail.com

**ASSESSMENT OF LEUKOCYTE BLOOD COUNT AND FUNCTIONAL ACTIVITY
IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH TICK-BORNE INFECTIONS**

K.V. Samoilov, A.V. Semenova, O.V. Yampolskaya

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., Dr., O.V. Voronkova

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovsky trakt, 2, 634050

E-mail: samoilov.krl@gmail.com

Abstract. *There are scientific interest and practical potential in a comparative study of peripheral blood leukocytes in patients with tick-borne infections. The study aim was to identify general patterns and features of the functional status violations of peripheral blood leukocytes in patients with ixodid tick-borne borreliosis (ITB) and tick-borne encephalitis (TBE). The venous blood of 24 males and females from 18 to 79 years old with ITB, TBE, and healthy volunteers was the material for this study. Analysis of the quantitative composition and functional activity of blood leukocytes was carried out on a hematological analyzer Sysmex XN1000, to quantitatively determine the immune cells secretory activity. The concentration of IL-4, IL-10, TNF α , IFN- γ was investigated by enzyme immunoassay. Blood mononuclear leukocytes were cultured in vitro to assess spontaneous and antigen-stimulated production of IL4, IL10, TNF α , IFN- γ . Lipopolysaccharide (LPS) and phytohemagglutinin (PHA) were used as inducers. We used the STATISTICA 13 package. Peripheral blood immune cells constitutional and secretory properties was revealed the functional disorganization in acute course of both tick-borne neuroinfections. The production of cytokines with pro-inflammatory effects is more pronounced in the acute course of both tick-borne neuroinfections; it is stimulated in the acute course of TBE. The failure of the mechanisms of antimicrobial protection in tick-borne infections is most likely associated with a violation of the functional capabilities of cells.*

Введение. Томская область относится к регионам с высоким распространением инфекций, переносимых клещами, прежде всего – клещевого энцефалита (КЭ) и иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ). Центральным звеном всего каскада антимикробных реакций макроорганизма являются лейкоциты периферической крови. В связи с этим сравнительное изучение лейкоцитов периферической крови у пациентов с клещевыми инфекциями имеет научный и практический интерес [1, 2].

Целью нашего исследования было выявить общие закономерности и особенности нарушений функционального статуса лейкоцитов периферической крови у больных ИКБ и КЭ.

Экспериментальная часть. В работе использовали результаты обследования 22 лиц мужского и женского пола от 18 до 79 лет, 8 человек с острой безэритемной формой ИКБ, 7 – с лихорадочной или

менингеальной формой КЭ, а 7 здоровых добровольцев составили группу контроля. Материалом исследования являлась венозная кровь. Анализ количественного состава лейкоцитов крови проводили на гематологическом анализаторе *Symex XN1000* с технологией рефлекс-тестирования, позволяющей охарактеризовать реакцию лейкоцитов при инфекции и воспалении с помощью показателей гранулярности нейтрофилов (*NEUT-GI*), реактивности нейтрофилов (*NEUT-RI*), количества реактивных лимфоцитов (*RE-LYMP*). Цитокинсекреторную активность клеток определяли по концентрации интерлейкинов (*IL*) 4, 10, *TNF α* , *IFN- γ* методом ИФА. Для оценки спонтанной, антиген-стимулированной и митоген-стимулированной продукции вышеописанных цитокинов мононуклеарные лейкоциты крови культивировали *in vitro*. В качестве индукторов использовали липополисахарид (ЛПС) и фитогемагглютинин (ФГА). Статистическую обработку проводили в программе *STATISTICA 13*. Распределение признаков не соответствовало нормальному. Описание признаков проводилось в виде медианы и межквартильного размаха (*Me (Q₁; Q₃)*). Для межгрупповых сравнений независимых признаков использован критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони.

Таблица 1

Показатели лейкограммы с расширенным профилем у пациентов с клещевыми инфекциями, *Me (Q₁; Q₃)*

Исследуемые параметры	Здоровые лица	Пациенты с ИКБ	Пациенты с КЭ
Общее количество лейкоцитов в крови (WBC), $\times 10^9/\text{л}$	5,29 (4,17; 6,37)	6,22 (5,44; 6,92)	7,12 (6,30; 8,17) $p_1 = 0,026$
Эозинофилы, %	2,40 (1,30; 3,10)	3,40 (2,70; 4,55)	0,10 (0,00; 2,90)
Нейтрофилы, %	51,40 (47,50; 55,40)	56,10 (49,75; 60,20)	63,70 (54,30; 70,70)
Лимфоциты, %	38,10 (30,90; 39,60)	29,40 (27,15; 34,55)	24,10 (21,10; 29,00)
Моноциты, %	8,70 (7,30; 9,40)	8,95 (7,95; 9,95)	6,90 (6,10; 7,30) $p_2 = 0,014$
Базофилы, %	0,90 (0,60; 1,00)	0,55 (0,40; 0,80)	0,20 (0,00; 0,30) $p_1 = 0,004; p_2 = 0,018$
NEUT-GI, SI	150,30 (148,70; 154,90)	155,10 (151,55; 159,15)	151,00 (143,90; 153,80)
NEUT-RI, FI	45,90 (43,90; 46,80)	46,70 (45,70; 47,35)	46,30 (46,30; 46,70)
RE-LYMP, $10^9/\text{L}$	0,90 (0,60; 1,30)	0,06 (0,05; 0,11) $p_1 = 0,001$	0,08 (0,05; 0,10) $p_1 = 0,005$

Примечание: p_1 – уровень значимости различий при сравнении с параметрами у здоровых лиц; p_2 – при сравнении с параметрами у пациентов с разными клещевыми инфекциями.

Результаты. Исследование показало статистически значимое увеличение содержания лейкоцитов в периферической крови пациентов с КЭ (табл. 1) по сравнению со здоровыми добровольцами. Содержание моноцитов в группе с КЭ было статистически значимо ниже, чем при боррелиозе. Количество базофилов (как абсолютное, так и относительное) в крови больных КЭ было значимо снижено, как по сравнению с больными боррелиозом, так и со здоровыми донорами. Обращало на себя внимание значительное снижение количества реактивных лимфоцитов *RE-LYMP* в обеих группах пациентов по сравнению с группой контроля.

Базальный уровень *IL-4* у пациентов с ИКБ был равен 30,26 (27,64; 31,32), с КЭ – 10,51 (6,50; 23,88), что значительно превышало показатель в группе контроля (2,92 (2,51; 4,93), $p = 0,001$ для обеих выборок). Стимуляция клеток ФГА усилила продукцию *IL-4* у пациентов с ИКБ до 42,14 (32,11; 63,46), достоверно выше ($p = 0,002$), чем в контроле – 19,73 (10,20; 22,32), а ЛПС усилил продукцию в обеих опытных группах (ИКБ – 78,34 (61,48; 93,22), КЭ – 33,88 (26,40; 52,81) по сравнению с контрольной (10,81 (6,43; 12,44), $p = 0,001$ в обоих случаях). При этом в группе с ИКБ активность была выше, чем в группе с КЭ ($p = 0,008$). Базальная секреция *IL-10* в опытных группах так же была выше (ИКБ – 57,76 (25,91; 154,85), КЭ – 37,28 (12,89; 53,71), чем в контрольной (9,36 (2,45; 12,65), $p = 0,006$ и $0,04$ соответственно), а стимуляция секреции ФГА вызвала более выраженную секрецию цитокинов в группе ИКБ (102,39 (66,85; 120,65) при 27,39 (12,87; 59,75) в контроле, $p=0,009$). ЛПС вызвал усиление секреции в обеих опытных группах значимо выше, чем в контрольной (ИКБ – 159,45 (114,04; 178,05), КЭ – 112,20 (85,75; 186,40), контроль 63,80 (43,52; 11,40), $p = 0,02$ и $p = 0,04$ соответственно). Базальная и ФГА-стимулированная секреция *IFN- γ* в опытных и контрольной группах была аналогична, только стимуляция клеток ЛПС вызвала различную реакцию. Клетки пациентов с КЭ дали значимо более активную секрецию этого цитокина (126,90 (124,30; 154,80) как в сравнении с группой пациентов с ИКБ (54,84 (18,96; 72,05), $p = 0,01$), так и с контрольной группой (44,89 (25,91; 56,62), $p = 0,008$). Схожая тенденция наблюдалась и для секреции *TNF α* : ЛПС вызывал увеличение секреции в клетках пациентов с КЭ более выражено (354,20 (345,30; 607,32)), чем в клетках пациентов с ИКБ (120,10 (112,43; 124,82), $p = 0,0006$) и контрольной группе (334,40 (323,80; 335,40), $p = 0,02$). Не было выявлено статистически значимых различий концентрации *TNF α* в базальной секреции и после стимуляции ФГА.

Заключение. Таким образом, при остром течении обеих клещевых нейроинфекций была выявлена функциональная дезорганизация конституциональных и секреторных свойств иммунных клеток периферической крови. Продукция цитокинов с провоспалительными эффектами стимулируется более выражено при остром течении КЭ (преимущественно за счёт *TNF- α* , *IFN- γ*), чем при ИКБ. В случае боррелиоза был отмечен рост продукции противовоспалительного ИЛ-10, который, наиболее вероятно, подавлял секрецию *IFN- γ* и *TNF- α* . Несостоятельность механизмов противомикробной защиты при клещевых инфекциях связана, скорее всего, с нарушением функциональных возможностей клеток.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-15-20010, <https://rscf.ru/project/22-15-20010/> и средств Администрации Томской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Леонова Г.Н., Павленко Е.В., Запорожец Т.С., Смолина Т.П., Гажа А.К., Новиков Д.В., Ченцова И.В., Крылова Н.В. Комплексная оценка состояния иммунной системы при различных формах клещевого энцефалита в остром периоде // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 4-5. – С. 313-320.
2. Gudowska-Sawczuk M, Mroczko B. Selected biomarkers of tick-borne encephalitis: a review. // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22., no. 19. – P. 10615. doi:10.3390/ijms221910615

УДК 612.17

**СТИМУЛЯЦИЯ КАННАБИНОИДНЫХ СВ2 РЕЦЕПТРОВ ПРЕДУПРЕЖДАЕТ
РЕПЕРФУЗИОННОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ СЕРДЦА**М.А. Сиротина

Научный руководитель: профессор, д.м.н., Л.Н. Маслов

НИИ кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр,

Россия, г. Томск, ул. Киевская, 111 а, 634012

E-mail: sirotina_maria@mail.ru**STIMULATION OF CANNABINOID CB2 RECEPTOR PREVENTS CARDIAC REPERFUSION
INJURY**М.А. Sirotina

Scientific Supervisor: Prof., Dr., L.N. Maslov

Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kievskaya str., 111 a, 634012

E-mail: sirotina_maria@mail.ru

Abstract. *Ischemic and reperfusion injury of the heart underlies the pathogenesis of acute myocardial infarction. Percutaneous coronary intervention reduces in-hospital mortality from AMI to 6 - 7%. In-hospital mortality in patients with myocardial infarction is not reduced in cardiology centres in recent years. The reason is the lack of highly effective drugs that can prevent cardiac reperfusion injury in clinical practice. Our preliminary data indicate that similar drugs can be created on the basis of cannabinoids. The study was performed on female Wistar rats. The rats underwent coronary artery occlusion (45 min) and reperfusion (120 min) then myocardial sections were prepared and stained. The planimetric method was used to evaluate the infarct size/area at risk ratio. It was shown that administration of cannabinoid receptor agonists can reduce infarct size. Thus, it could be concluded that cannabinoid type 2 receptor agonists JWH133 and HU-910 are able to prevent cardiac reperfusion injury.*

Введение. Ишемическое и реперфузионное повреждение сердца лежит в основе патогенеза острого инфаркта миокарда. Изучение механизмов, лежащих в основе патогенеза ишемического/реперфузионного (И/Р) повреждения сердца, проводятся на протяжении сорока лет [1].

В настоящее время, несмотря на успехи современной кардиологии, в Российских специализированных кардиологических центрах внутригоспитальная летальность у пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST составляет 6 – 7 % [2]. Одной из причин такой летальности является отсутствие в клинической практике лекарственных препаратов, способных с высокой эффективностью защитить миокард от реперфузионных повреждений [3], поэтому остается актуальным поиск и разработка лекарственных препаратов, предупреждающих реперфузионные повреждения сердца.

Как известно G-белок сопряженные рецепторы играют важную роль в регуляции толерантности сердца к И/Р [4]. К подобным рецепторам относятся аденозиновые, опиоидные, а также каннабиноидные рецепторы. В настоящее время есть ряд исследований, продемонстрировавших инфаркт-лимитирующий

эффект каннабиноидов [5, 6]. Однако роль отдельных субтипов каннабиноидных рецепторов в повышении толерантности сердца к реперфузии, до сих пор не изучена.

Цель исследования, выяснить, способны ли агонисты каннабиноидных рецепторов 2 типа предупреждать реперфузионное повреждение сердца.

Экспериментальная часть. Исследование выполнено на самках крыс Вистар ($n = 30$) массой 250-300 г в соответствии с международными стандартами гуманного обращения с животными (Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях). Крыс разделили на три группы (в каждой по 10 животных), у которых моделировали коронароокклюзию (45 мин) и реперфузию (2 ч) [7]. Животных наркотизировали внутрибрюшинным введением α -хлоралозы (50 мг/кг) и подключали к аппарату искусственной вентиляции легких «SAR-830 Series».

Выявляли зону некроза (ЗН) и область риска (ЗР). Зона некроза выделялась из области риска путем окрашивания 1 % раствором 2,3,5-трифенилтетразолияхлорида (30 минут, 37 °С), являющегося индикатором жизнеспособных клеток и тканей.

Размер зоны риска и зоны некроза определяли компьютеризированным планиметрическим методом. Размер ЗН выражали в процентах от размера зоны гипоперфузии (зона риска), как соотношение ЗН/ЗР. В работе использовали агонисты каннабиноидных CB2 рецепторов JWH133 и HU-910. Препараты вводили внутривенно за 5 минут до реперфузии.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA 13.0. (StatSoft, Inc., США). Пороговый уровень значимости при проверке статистических гипотез $p = 0,05$.

Результаты. В контрольной группе отношение ЗН/ЗР составляло 52,6 %. После внутривенного введения агониста каннабиноидных CB2 рецепторов JWH133 было выявлено достоверное уменьшение индекса ЗН/ЗР в 2 раза по сравнению с контрольными животными.

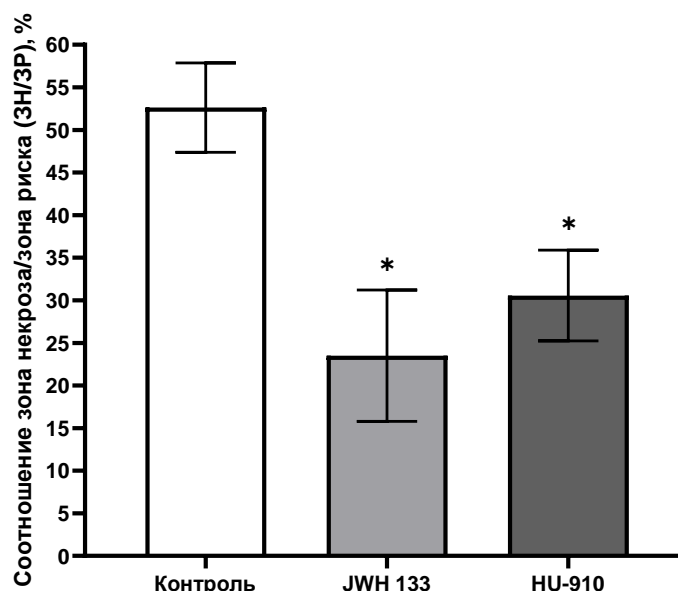


Рис. 1. Сравнение области инфаркта по группам

Примечание: * – значимые отличия по сравнению с группой контроля при $p < 0,05$

При использовании агониста каннабиноидных CB2 рецепторов HU-910 также было зафиксировано статистически значимое снижения соотношения ЗН/ЗР (Рисунок 1). Полученные данные свидетельствуют, что агонисты каннабиноидных рецепторов 2 типа участвуют в инфаркт-лимитирующем эффекте. В свою очередь механизм реализации данного эффекта еще не изучен.

Заключение. Таким образом, установлено, что агонисты каннабиноидных рецепторов 2 типа JWH133 и HU-910 способны предупреждать реперфузионные повреждения сердца.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chandra R., Baumann F.G., Goldman R.A. Myocardial reperfusion, a cause of ischemic injury during cardiopulmonary bypass // *Surgery*. – 1976. – V. 80., №. 2. – P. 266-276.
2. Bessonov I.S. et al. Influence of Total Ischemic Time on Clinical Outcomes in Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction // *Kardiologija*. – 2021. – V. 61., №. 2. – P. 40-46.
3. Маслов Л.Н., Барбараш О. Фармакологические подходы к ограничению размера инфаркта у пациентов с острым инфарктом миокарда. Анализ клинических данных // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2018. – Т. 81., №. 3. – С. 34-41.
4. de Miranda D.C. et al. Pre-and post-conditioning of the heart: an overview of cardioprotective signaling pathways // *Current Vascular Pharmacology*. – 2021. – V. 19., №. 5. – P. 499-524.
5. Hillard C.J. Circulating endocannabinoids: from whence do they come and where are they going? // *Neuropsychopharmacology*. – 2018. – V. 43., №. 1. – P. 155-172.
6. Lee D.I. et al. Cannabinoid receptor agonist inhibits atrial electrical remodeling in a tachypaced Ex Vivo rat model // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. – V. 12. – P. 642398.
7. Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J. Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (δ)-opioid receptor in the intact rat heart // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 1997. – V. 29., №. 8. – P. 2187-2195.

УДК 571.27

**ФАКТОРЫ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ, МОДУЛИРУЮЩИЕ ЭКСПРЕССИЮ
PFKFB3 В МАКРОФАГАХ**

Т.С. Сударских¹, М.А. Ракина¹, И.В. Ларионова^{1,2}

Научный руководитель: профессор, д.б.н., Ю.Г. Кжышковска^{1,2}

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

²НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр,
Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

E-mail: tanya-sudarskih@mail.ru

**TUMOR MICROENVIRONMENT FACTORS MODULATING PFKFB3 EXPRESSION IN
MACROPHAGES**

T.S. Sudarskikh¹, M.A. Rakina¹, I.V. Larionova^{1,2}

Scientific Supervisor: Prof., Dr., J.G. Kzhyshkowska^{1,2}

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

²Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634009

E-mail: tanya-sudarskih@mail.ru

Abstract. PFKFB3 is an important regulator of glycolysis in the body [1]. Many studies have shown that PFKFB3 is associated with the progression of different types of tumors [2]. In addition, PFKFB3 is expressed on macrophages and monocytes, which actively infiltrate tumor tissue [3]. For this study, monocytes were isolated from the blood of healthy donors, which were then differentiated during cultivation into 4 types of macrophages: M0, M1, M2 and tumor-associated macrophages. On each type of macrophages, we analyzed the effect of anti-inflammatory and pro-tumor factors, such as IL-10, LPS, S100A4, EGF, SPPI, TGFb, on the expression of PFKFB3.

Введение. PFKFB3 является одним из регуляторов процесса гликолиза в организме и играет важную роль в выживании и пролиферации опухолевых клеток [1]. Повышенная экспрессия PFKFB3 часто обнаруживается при различных онкологических заболеваниях: раке молочной железы, раке толстой кишки, карциноме носоглотки, раке поджелудочной железы, раке желудка и других [2]. Повышенный метаболизм глюкозы способствует выживанию раковых клеток в микросреде с ограниченным поступлением кислорода, а также выработке лактата, который ускоряет развитие метастазов за счет изменения кислотности среды [1]. Нами недавно было показано, что PFKFB3 преимущественно экспрессируется на CD14+CD68+ макрофагах, рекрутированных из моноцитов, которые массово инфильтрируют опухолевую ткань. Кроме того, было обнаружено, что PFKFB3 коррелирует с маркерами поляризации макрофагов M2-типа, такими как CD163, CD206, CD204 и MARCO [3].

Целью данного исследования является выявление факторов опухолевой среды, влияющих на экспрессию гена PFKFB3 в макрофагах различного типа.

Экспериментальная часть. Моноциты выделяли из лейкотромбослоя крови 4-х здоровых доноров методом центрифугирования в градиенте плотности фикола и перколла. Обогащенная моноцитами фракция использовалась для магнитной сортировки (MACS) с использованием CD14-позитивной селекции. Полученная таким образом клеточная популяция содержала 95-98 % моноцитов, что контролировалось при помощи анализа поверхностной экспрессии маркера моноцитов CD14 проточной цитометрией.

Моноциты от 4 здоровых доноров культивировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл при 37°C в течение 6 дней в среде X-VIVO. Все макрофаги стимулировали M-CSF (1 нг/мл) и дексаметазоном 10^{-8} М. Для поляризации макрофагов в M1 добавляли IFN γ (100 нг/мл), в M2 – IL-4 (10 нг/мл), в опухолеассоциированные макрофаги (OAM) – 80 % X-VIVO и 20 % опухолевого супернатанта клеточной линии колоректального рака (KPP) Caco2. Макрофаги M0 были без дополнительной стимуляции. Затем в культуру макрофагов добавляли различные провоспалительные и опухолеассоциированные факторы: IL-10 (10 нг/мл), LPS (5 мкг/мл), S100A4 (1 мкг/мл), EGF (10 нг/мл), SPP1 (1 мкг/мл), TGF β (10 нг/мл). Оценивали влияние этих факторов на генную экспрессию PFKFB3. Также в каждой группе макрофагов был не стимулированный контроль (ns). После 6 дней культивирования клетки собирали для выделения РНК и дальнейшего синтеза кДНК.

Выделение РНК из образцов OAM проводилось с использованием набора RNeasy mini kit (Qiagen, Германия) по стандартной методике. Для получения кДНК на матрице мРНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAidTM (Thermo Fisher Scientific, США) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору. ПЦР в реальном времени использовали для измерения экспрессии гена с использованием термоциклера AriaMx Real-Time PCR (Agilent Technologies, США). Экспрессию гена измеряли с использованием технологии Taqman и нормализовали по экспрессии гена домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

Результаты. В ходе выполнения работы было показано, что экспрессия PFKFB3 статистически значимо понижается при добавлении к не стимулированным макрофагам (M0) фактора M2-поляризации макрофагов IL-4 ($p < 0,05$) (рисунок 1А). При стимуляции M0 макрофагов IFN γ (M1-поляризационный фактор), наоборот, была тенденция к увеличению экспрессии PFKFB3 ($p < 0,1$). Опухолевые супернатанты от клеток KPP (Caco2), с помощью которых были получены модельные OAM in vitro, значительно стимулировали экспрессию PFKFB3 ($p < 0,1$). При стимуляции M0 макрофагов IL-10, LPS, S100A4, EGF, SPP1 и TGF β статистически значимых отличий не наблюдалось.

В системе IFN γ -стимулированных M1 макрофагов экспрессия PFKFB3 статистически значимо ($p < 0,05$) ингибировалась под влиянием LPS, и наблюдалась тенденция к статистически значимому снижению PFKFB3 экспрессии ($p < 0,1$) под влиянием M2 противовоспалительного маркера IL-10 и про-ангиогенного фактора SPP1 (рисунок 1Б). Однако, в системе IL-4-стимулированных M2 макрофагов, добавление SPP1, наоборот, стимулировало экспрессию PFKFB3 ($p < 0,05$) (рисунок 1В). Интересно, что опухолевые супернатанты повышали экспрессию PFKFB3 (рисунок 1А), однако в самих модельных OAM, стимулированных опухолевыми супернатантами, ни один из факторов не показал дополнительной активации PFKFB3 экспрессии (рисунок 1Г).

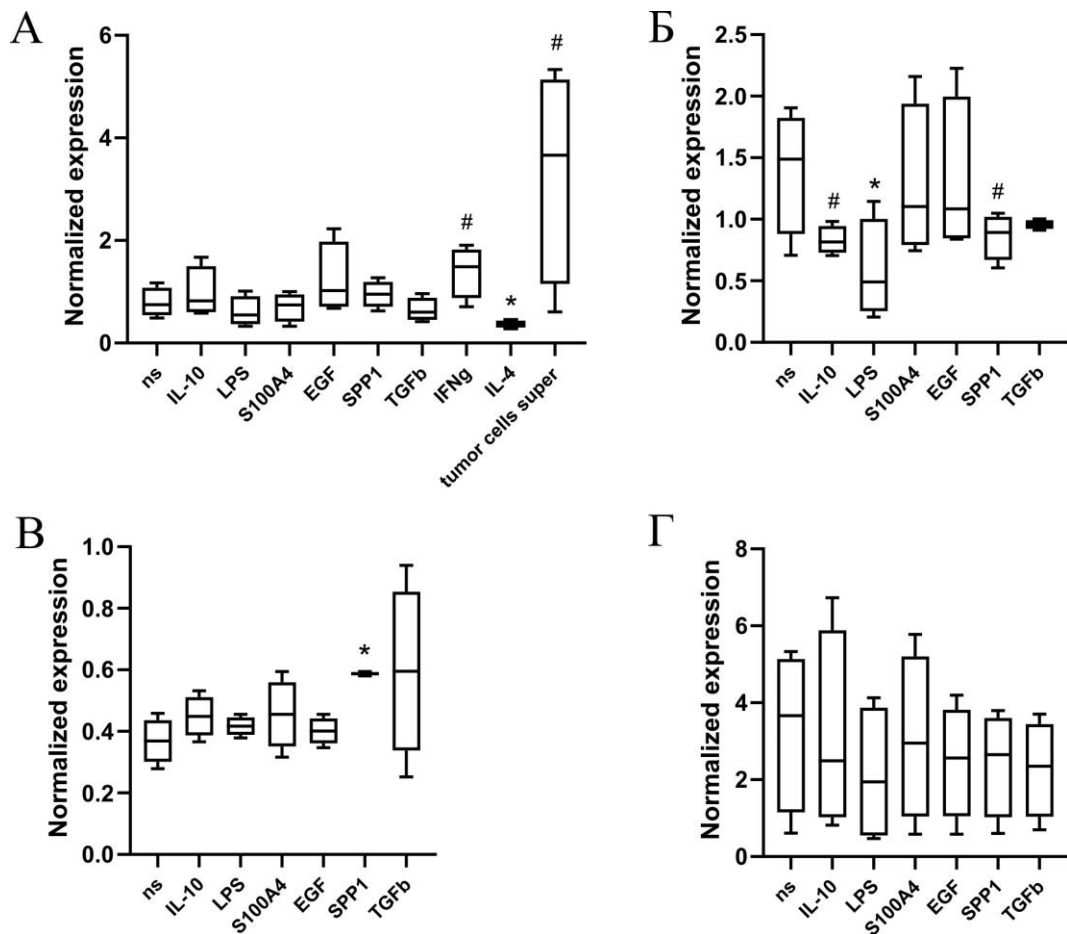


Рис. 1. Изменение экспрессии гена PFKFB3 в системе макрофагов: А – M0; Б – M1; В – M2; Г - OAM (# – $p < 0,1$; * – $p < 0,05$)

Заключение. Таким образом, был выполнен поиск опухоль-ассоциированных факторов, которые влияют на экспрессию PFKFB3 в макрофагах различного типа *ex vivo*. Интересно, что экспрессия PFKFB3 повышается в макрофагах, помещенных в опухолевую кондиционированную среду, в то время как отдельно M2-поляризационные факторы понижают его экспрессию.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РНФ №19-15-00151.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kotowski K. et. all. Role of PFKFB3 and PFKFB4 in Cancer: Genetic Basis, Impact on Disease Development/Progression, and Potential as Therapeutic Targets // *Cancers*. – 2021. – V. 13(4). – P. 1-29.
2. Shi L. et. all. Roles of PFKFB3 in cancer // *Signal transduction and targeted therapy*. – 2017. – V. 2. – P. 1-10.
3. Larionova I. et. all. PFKFB3 overexpression in monocytes of patients with colon but not rectal cancer programs pro-tumor macrophages and is indicative for higher risk of tumor relapse // *Frontiers in immunology*. – 2022. – V. 13. – P. 1-18.

УДК 577.29

**АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОЦЕССОВ АНГИОГЕНЕЗА, ВОСПАЛЕНИЯ
И ОРГАНИЗАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПРИ ОБРАБОТКЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ
РАН МЫШЕЙ БЕЛКАМИ ТРЕМАТОД *OPISTHORCHIS FELINEUS***

А.А. Тарасенко

Научный руководитель: д.б.н., М.Ю. Пахарукова
Новосибирский государственный университет,
Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 1, 630090
E-mail: a.tapacehko@gmail.com

**EFFECTS OF *OPISTHORCHIS FELINEUS* PROTEINS ON ANGIOGENIC, INFLAMMATORY
AND EXTRACELLULAR MATRIX ORGANIZATION GENE EXPRESSION DURING
THE TREATMENT OF MICE WOUND HEALING**

A.A. Tarasenko

Scientific Supervisor: Dr., M.Yu. Pakharukova
Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogov str., 1, 630090
E-mail: a.tapacehko@gmail.com

Abstract. *Chronic non-healing wounds are a worldwide major public health problem because they are delayed in one of the stages (hemostasis, inflammation, proliferation and remodeling), thus the healing process is incomplete. Therefore, the search for new effective nonspecific stimulators of wound healing is relevant.*

*The liver fluke *Opisthorchis felinus* is known for stimulation of proliferation processes of the bile duct epithelial cells. The idea was to investigate the ability of liver fluke proteins to stimulate the mouse skin wound healing.*

*The treatment with the *O. felinus* proteins promotes accelerated healing of full-thickness wounds. Presumably, the liver fluke produces factors that can be used to stimulate the mammalian tissue regeneration. The activity of the individual components of the secretory product must be further investigated in more detail.*

Введение. Заживление ран - нормальный физиологический процесс, который состоит из четырех фаз, перекрывающихся во времени: гемостаз, воспаление, пролиферация и ремоделирование. При заживлении ран происходит образование новой ткани, которой необходимы питательные вещества и кислород для роста. Для доставки кислорода и питательных веществ в раневую область необходимо активировать процесс образование новых кровеносных сосудов - ангиогенез [1]. Однако иногда в процессе заживления ран могут развиваться хронические незаживающие раны, которые задерживаются на одной из стадий и являются серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире [2, 3]. Поэтому поиск новых эффективных неспецифических стимуляторов заживления ран является актуальным.

Opisthorchis felinus является одним из возбудителей описторхоза у рыбоядных млекопитающих. Находясь внутри желчных протоков, описторх повреждает эпителиальные клетки желчных протоков во время миграции и питания, что приводит к активизации процессов заживления ран. Описторхоз до определенной стадии может протекать бессимптомно, поскольку паразиты обладают способностью снижать острое воспаление и стимулировать восстановление поврежденных эпителиальных клеток

(холангиоцитов) у млекопитающих с помощью экскреторно-секреторного продукта (ЭСП) [4]. Эти данные позволяют рассматривать белки трематод в качестве потенциального ранозаживляющего агента.

С целью исследования процессов ангиогенеза, воспаления и организации внеклеточного матрикса при стимуляции заживления ран были проведены эксперименты по обработке поверхностных ран мышей линии C57BL/6J препаратами экскреторно-секреторного продукта и лизата взрослых особей трематод *O. felineus*.

Экспериментальная часть. Образцы лизата и ЭСП *O. felineus* получали способами, описанными ранее [5, 6]. Дизайн эксперимента: мышей линии C57Bl/6 анестезировали эфиром, сбрасывали шерсть на спине и наносили резаную рану. Мышей разделили случайным образом на 8 групп, в каждой группе было по 5 животных. В течение следующих 10 дней обрабатывали раны антисептиком (хлоргексидин), наносили необходимый раствор, суспендированный в 1,5% метилцеллюлозе, и обрабатывали спреем-пластырем.

Раны мышей из групп контроля обрабатывали одним из следующих растворов: 1) хлоргексидин, 2) метилцеллюлоза, 3) бычий сывороточный альбумин (BSA) 10 мкг. Раны мышей из экспериментальных групп обрабатывали растворами: 1) ЭСП 1 мкг, 2) ЭСП 10 мкг, 3) ЭСП 10 мкг без эндотоксина, 4) лизат 10 мкг, 5) лизат 50 мкг. Соединительную ткань выявляли с помощью окрашивания гистологических срезов по Пикро-Маллори. Процент соединительной ткани в области раны определяли с помощью закрытой тест-системы на 100 баллов (Морфометрия и ImageJ Launcher 1.4.3.67).

Неоангиогенез определяли иммуногистохимическим анализом с использованием специфических первичных антител на белок CD34 (Abcam, ab81289, 1:300). Оценивали наличие мокрой корки («+/-»), эпителиальных валиков («+/-») и площадь инфильтрации («+++» – более 60 % площадь раны, «+ +» – от 20 до 60 % площади раны, «+» – менее 20 % площади раны) на гистологических срезах при помощи полуколичественного анализа.

Экспрессию генов определяли методом ОТ-ПЦР, уровень ангиогенеза *in vitro* оценивали с помощью метода формирования трубок (капилляро-подобных структур) на клетках эндотелиоцитах HUVEC, протеомный анализ выполнен с помощью ВЭЖХ и тандемной масс-спектрометрии, определение специфических белков паразита проводили с помощью Вестерн-блот анализа. Применяли непараметрический критерий Манна-Уитни для оценки достоверности различий между экспериментальными и контрольными группами.

Результаты. Показано, что ЭСП и белки лизата *O. felineus* способствуют более быстрому сокращению площади раны кожи мышей по сравнению с необработанной раной ($p < 0,05$). Через 10 дней после ранения оценка экспрессии генов *Arg1*, *Ltb4r1*, *Nos2*, связанных с воспалительными реакциями, гена *Vegfa*, отражающего процесс ангиогенеза, и *Col3*, демонстрирующего образование соединительной ткани, на уровне мРНК показала снижение уровней экспрессии данных генов в экспериментальных группах, до показателей, определяемых в здоровой коже ($p < 0,05$).

Уровень экспрессии генов *Acta2*, *Fgf2*, *Fn1*, *Tgf-β*, *Mmp2*, *Mmp9*, являющихся маркерами процессов организации внеклеточного матрикса, в экспериментальных группах снижался до показателей, определяемых в здоровой коже ($p < 0,05$). В необработанной ране уровни экспрессии генов *Ltb4r1*, *Nos2* (воспаление), *Vegfa* (ангиогенез), *Acta2*, *Fgf2*, *Fn1*, *Tgf-β*, *Mmp2*, *Mmp9* (организация нового внеклеточного матрикса) были повышены, а уровень экспрессии гена *Krt19* (эпителизация) был понижен по сравнению со здоровой кожей ($p < 0,05$). Все это свидетельствует о завершении процессов воспаления, образования новых кровеносных сосудов, образования соединительной ткани, организации

внеклеточного матрикса в экспериментальных группах при обработке ран белками трематоды. Результаты по формированию капилляро-подобных структур эндотелиоцитами HUVEC свидетельствуют о стимулировании ангиогенеза.

Заключение. Таким образом, в работе продемонстрирован ранозаживляющий потенциал экскреторно-секреторного продукта и лизата трематоды *O. felinus*. Дальнейшие исследования белковой фракцией ЭСП представляются перспективными для поиска новых биоактивных пептидов для корректировки различных патологических состояний, в результате которых образуются хронические незаживающие раны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fraisl P. et al. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism // *Developmental cell*. – 2009. – V. 16., № 2. – P. 167-179.
2. Han G., Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments // *Advances in Therapy*. – 2017. – V. 34. – P. 599-610.
3. Takeo M., Lee W., Ito M. Wound Healing and Skin Regeneration // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2015. – V. 5., № 1.
4. Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., et al. *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia // *Parasitology International*. – 2012. – V. 61, № 1. – P. 25-31.
5. Pakharukova M.Y. et al. Inhibition of *Opisthorchis felinus* glutathione-dependent prostaglandin synthase by resveratrol correlates with attenuation of cholangiocyte neoplasia in a hamster model of opisthorchiasis // *International journal for parasitology*. – 2019. – V. 49., №. 12. – P. 963-973.
6. Львова М.Н. Экспериментальное исследование патогенеза описторхоза, вызванного трематодой *Opisthorchis felinus*: дис. канд. биол. наук: 03.03.04. – Новосибирск, 2020. – 150 с.

УДК 538.911

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ И ОБРАБОТКИ ПОВЕРХНОСТИ
БИОМАТЕРИАЛА ИЗ НИКЕЛИДА ТИТАНА (ТН-10) НА ЦИТОСОВМЕСТИМОСТЬ
С КЛЕТКАМИ ЛИНИИ 3Т3 (ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ ФИБРОБЛАСТЫ)**

А.М. Темирова

Научный руководитель: профессор, д.ф.-м.н., О.В. Кокорев
Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050
E-mail: lina.9093@bk.ru

**EFFECT OF VARIOUS METHODS OF STERILIZATION AND SURFACE TREATMENT
OF TITANIUM NICKELIDE (TN-10) BIOMATERIAL ON CYTOCOMPATIBILITY
WITH 3T3 CELLS (EMBRYONIC FIBROBLASTS)**

A.M. Temirova

Scientific Supervisor: Prof., Dr., O.V. Kokorev
Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050
E-mail: lina.9093@bk.ru

Abstract. *The study was conducted to evaluate the effect of various methods of sterilization and surface treatment of titanium nickelide biomaterial (TN-10) on cytocompatibility with 3T3 cells (embryonic fibroblasts). Sterilization methods were used, such as autoclaving, sonication, dry heat treatment, treatment with concentrated NaOH alkali, Annealing at 900C, treatment with a mixture of acids 1HF + 3HNO₃ + 10H₂O, treatment with 6% hydrogen peroxide, boiling in dis. water. The results showed that the methods of sterilization and surface treatment affect the cytocompatibility of the biomaterial with 3T3 cells. Some methods of sterilization and surface treatment lead to a decrease in the cytotoxicity of the biomaterial, while other methods can worsen its cytocompatibility.*

Введение. Биоматериалы, изготовленные из никелида титана (ТН-10), широко используются в медицинских приложениях, таких как имплантация костей и зубов, благодаря их прочности, устойчивости к коррозии и биосовместимости. Однако, перед использованием, биоматериалы должны быть стерилизованы и подвергнуты обработке поверхности для предотвращения возможных инфекций и улучшения адгезии клеток. В настоящее время существует множество методов стерилизации и обработки поверхности биоматериалов, но их влияние на цитосовместимость с клетками линии 3Т3 (эмбриональные фибробласты) не изучено полностью [1-4].

Характерные свойства никелида титана, такие как эффект памяти формы, сверхэластичность, высокая коррозионная стойкость и демпфирующая способность, позволяют использовать сплавы в различных областях медицины. Монолитные сплавы при изготовлении и стерилизации различными методами претерпевают структурно-фазовые изменения в поверхностных и приповерхностных слоях, что требует определенный контроль. Новые свойства, характеризующие измененную поверхность, важны для биосовместимости имплантатов и требуют системного изучения [5].

Целью настоящей работы является изучение влияния различных методов стерилизации и обработки поверхности биоматериала из никелида титана (ТН-10) на цитосовместимость с клетками линии 3Т3 (эмбриональные фибробласты).

Экспериментальная часть. Образцы. Монолитные пластины 2x10x10 мм по 5 штук на каждую обработку. Перед исследованиями образцы стерилизовали при 180 °С в течение 60 мин в сухожаровом шкафу. В тестах на биосовместимость использовались 8 видов образцов по 3 штуки. В исследовании использовалась культура клеток 3Т3 (линия эмбриональных фибробластов мыши).

Методы обработки образцов из никелида титана:

1. Сухожаровая обработка 180 °С 60 мин (Контроль)
2. Обработка концентрированной щелочью NaOH 30 мин (Щелочь)
3. Отжиг 900 °С 5 мин (Отжиг)
4. Обработка смесью кислот $\text{1HF} + \text{3HNO}_3 + \text{10H}_2\text{O}$ 5 мин (Кислота)
5. Обработка 6 % перекисью водорода 30 мин (Перекись)
6. Кипячение в дистиллированной воде 30 мин (Кипячение)
7. Обработка в ультразвуковой ванне со спиртом 30 мин (УЗ+спирт)

Статичное культивирование и МТТ – тест. Клетки 3Т3 велись в CO_2 -инкубаторе в стандартных условиях при температуре 37 °С, 5 % CO_2 при 100 % влажности в полной культуральной среде. Полная культуральная среда состояла из DMEM/F12 («Панэко», РФ) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки («Панэко», РФ), 40 мкг/мл гентамицина и 250 мг/л глутамина.

Образцы были исследованы при статичном культивировании в стандартной культуральной посуде – 12-ти луночном планшете. Тесты на цитотоксичность проводили методом прямого контакта. Контрольные группы включали использование клеток в полной культуральной среде без образцов. Образцы вместе с клетками инкубировали в 12-луночных планшетах для культивирования клеток в среде в течение 24 часов. После этого реактив МТТ добавляли в каждую лунку. Образцы инкубировали с МТТ в течение 4 ч при 37 °С, затем планшеты центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об / мин, супернатант осторожно удаляли и в каждую лунку добавляли раствор для растворения (10 % SDS в 0,01 М HCl). Спектрофотометрическое поглощение образцов измеряли при 540 нм на Thermo Scientific Multiskan FC (China) с эталонной длиной волны 630 нм.

Индекс цитотоксичности = $(\text{K}-\text{O})/\text{K} \times 100\%$, где O – показатель экстинции опытной пробы, K – показатель экстинции контрольной пробы.

Статистический анализ. Результаты выражены как среднее \pm стандартное отклонение, где $n \pm 5$. Столбики погрешностей на рисунках представляют собой стандартные отклонения. Поскольку в исследовании присутствовали выборки, закон распределения числовых показателей в которых отличался от нормального (по данным проверки с помощью критерия Колмогорова–Смирнова), достоверность различий изучаемых признаков проверяли с помощью непараметрического U критерия Манна–Уитни (попарные сравнения независимых совокупностей показателей), при этом $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты. Клетки линии 3Т3 в течение 24 часов инкубировали на никелидтитановых образцах и оценивали цитотоксичность с помощью МТТ-теста в статической культуре. На рис. 1 показано сравнение цитотоксической способности образцов в тесте МТТ.

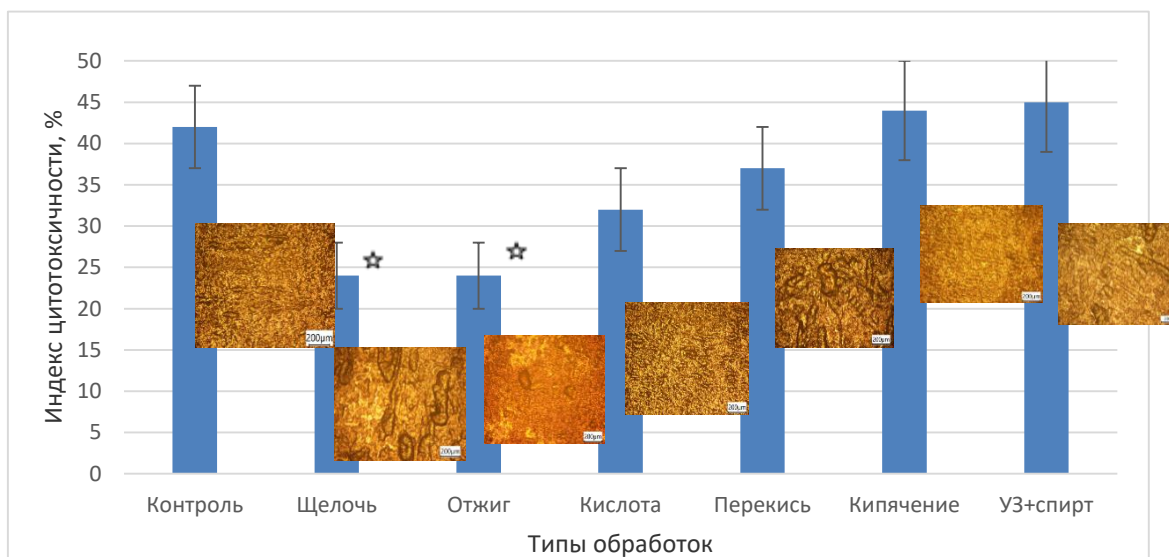


Рис. 1. – Индекс цитостатического влияния образцов из никелида титана марки TN-10, после различных методов стерилизации и модификации поверхности, на клетки линии 3Т3

☆ – различия достоверны при $p < 0,05$ по отношению к группам «Контроль», «Перекись», «Кипячение» и «УЗ-спирт». Результаты представлены как $X_{cp} \pm$ среднеквадратичное отклонение.

Заключение. Обнаружен низкий уровень цитотоксичности с клетками линии 3Т3 в течении 24 часов у образцов №2 и №6 (24 ± 4 %), что говорит о хорошей цитосовместимости данных образцов. У образцов №1 индекс цитотоксичности недостоверно превысил эти показатели на 8 % и составил 32 ± 4 % (средний уровень цитотоксичности). Образцы № 3, № 4, № 5 и № 8 показали средний уровень цитотоксичности от 37 до 45 %, что говорит об их более низкой цитосовместимости после данных видов обработки поверхности.

Показано, что отжиг при 900 °С и обработка концентрированной щелочью монолитных сплавов из никелида титана способствует увеличению цитосовместимости по сравнению с другими исследованными видами модификаций поверхности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эппле М. Биоматериалы и биоминерализация: пер. с нем. – Томск: Ветер, 2007. – 165 с.
2. Баринов С.М., Комлев В.С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. – М.: Наука, 2005. – 204 с.
3. Barinov S.M., Komlev V.S. Calcium phosphate based bioceramics for bone tissue engineering. // Trans Tech Publications. – 2008. – P. 170.
4. Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine / Editors: B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons. – 2012. – 1573 pp.
5. Горелых Е.А., Макаров С.С., Бежин А.И., Жилыева Л.В. Сравнительная микробиологическая оценка хирургических нитей с антибактериальными свойствами (экспериментальное исследование) // Медицинские импланты: Матер. Междунар. науч.-практ. конф. – Курск, 2016. – С. 50-51.

УДК 612.111.4

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ ДИАТОМИТА
КУКУРБИТ[6]УРИЛОМ НА ГЕМОЛИТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ**Д.А. Федоришин, Г.К. Жумабаева, А.Э. Ухов

Научный руководитель: профессор, д.х.н., А.А. Бакибаев

Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: strix187@yandex.ru**EFFECT OF DIFFERENT METHODS OF DIATOMITE SURFACE MODIFICATION
BY CUCURBIT[6]JURYL ON HEMOLYTIC EFFECT**D.A. Fedorishin, G.K. Zhumabaeva, A.E. Ukhov,

Scientific Supervisor: Prof., Dr. A.A. Bakibaev

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: strix187@yandex.ru

***Abstract.** The use of natural diatomite in a wide variety of applications is now becoming particularly relevant. One way to improve biocompatibility is to modify these materials with nitrogen-containing supramolecular heterocycles. In this study, the cytocompatibility of CB[6]-modified diatomite scaffolds was studied by evaluating their hemolytic activity. Low hemolytic activity of CB[6]-modified samples was shown. The optimal parameters of the methods of applying CB[6] to the samples were established.*

Введение. В настоящее время особо актуальным становится использование природного диатомита в самых различных областях деятельности. Диатомит или диатомовая земля – это окаменелые остатки диатомовых планктонных водорослей, обитающих во всех водах земли. Это удобрение, минеральная добавка-премикс, чистящее средство и биологический инсектицид одновременно [1]. Так же особо актуальным становится применение диатомита в качестве сорбента и гемостатика для сельскохозяйственных животных. Диатомит не токсичен и не имеет запаха, присутствует в природе в больших количествах и с высокой степенью чистоты, и, как следствие, доступен по низкой цене. Среди природных материалов диатомит представляет особый интерес благодаря своим уникальным свойствам, таким как высокая пористость, высокая проницаемость, малый размер частиц, большая площадь поверхности, низкая теплопроводность и химическая инертность. Кроме того, уникальная мезопористая структура панциря диатомовых водорослей открывает новые перспективы в области создания имплантатов, имитирующих строение кости. Поэтому диатомит мог бы использоваться как перспективный компонент биоматериалов медицинского назначения [1].

Однако при этом остро стоит проблема дальнейшего повышения физиологической совместимости. Существует много путей решения данной проблемы. Одним из таких путей является придание имплантируемым материалам биоподобия [2].

Создание биоподобных материалов – весьма сложная задача. Некоторое время назад открыта группа азотсодержащих соединений, называемых кукурбитурилами. Особенностью данных соединений

является их биоподобность, что обеспечивает высокую вовлеченность в естественные биологические процессы, и, как следствие, высокую биосовместимость. Кукурбитурилы представляют собой молодое семейство молекулярных контейнеров, способных образовывать устойчивые комплексы с различными соединениями-«гостями» [2]. Исходя из этого, можно придавать материалам различные необходимые свойства.

Любой материал, попадающий в организм, должен быть как можно менее токсичным. Один из способов оценки общей цитотоксичности – изучение гемолитической активности. Гемолиз – это процесс высвобождения гемоглобина в результате эритролиза. Тест на гемолиз основан на степени диссоциации эритролиза и гемоглобина при контакте материала с эритроцитами *in vitro*.

Целью исследования является оценка гемосовместимости скаффолдов из диатомита, модифицированных кукурбитурилом (СВ[6]) различными методами.

Экспериментальная часть. В данном исследовании использовались образцы, представляющие собой прессованные скаффолды из диатомита, имеющие форму цилиндра диаметром 20 мм и высотой 3 мм. Было исследовано два вида диатомита – интактный, представляющий собой неочищенный природный материал (ГДА) и очищенный кипячением в соляной кислоте (ЧДА). Для их модификации использовалось одно азотсодержащее макроциклическое соединение – кукурбитурил (СВ[6]). СВ[6] – наиболее распространенный представитель кукурбитурилов. В качестве контроля использовались образцы, подвергнутые аналогичному воздействию, но без нанесения СВ[6], (КТРЛ).

Модификация поверхности представленных на исследование образцов представляла собой нанесение на них СВ[6] и осуществлялась 4 методами – окунанием ($n = 3$), (ОК); вакуумным нанесением ($n = 3$), (ВАК); ультразвуковой ($n = 3$); и СВЧ-модификацией ($n = 3$). Во всех методах использовался 1 % раствор СВ[6] в дистиллированной воде. Время экспозиции во всех случаях составляло 40 мин. При окунании образцы окунали в раствор в СВ[6] с последующим высушиванием на воздухе при комнатной температуре. Вакуумное нанесение осуществлялось путем экспозиции скаффолдов в растворе СВ[6] при давлении воздуха 7,5 мбар при комнатной температуре. Ультразвуковое нанесение осуществлялось с помощью ультразвуковой ванны ПСБ-1360-05 (Экотон, Россия) (60 кГц, 75 Вт). СВЧ-нанесение осуществлялось при 50 °С с помощью лабораторной системы для микроволнового синтеза Speedwave four Microwave Digestion Systems (Berghof Products, Germany) при 95 % мощности.

Для оценки гемосовместимости образцов использовалась цельная гемостатированная кровь здорового донора. Кровь центрифугировали и отделяли эритромассу. Полученную эритромассу разводили стерильным раствором 1X PBS с температурой 37 °С в соотношении 1:9. Образцы помещали в стандартный 12-луночный планшет для культивирования клеток и заливали полученным раствором крови в PBS в соотношении 1 мл раствора на 1 см² площади поверхности образца. В качестве положительного контроля (100 % гемолиз) использовали деионизированную воду, в качестве отрицательного контроля использовали раствор 1X PBS (0 % гемолиз). Затем планшет инкубировали в термостате при 37 °С в течение 60 мин. После этого кровь из лунок планшета переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин для осаждения оставшихся эритроцитов. Затем осторожно удаляли супернатант и переносили в стандартный 96-луночный планшет для спектроскопического анализа и считывали оптическую плотность с помощью ИФА-ридера Tecan Infinite F50 (Tecan inc., USA) при 492 нм.

Процент гемолиза представлял собой среднее значение трех повторностей и рассчитывался по формуле:

$$\text{Hemolysis} = \frac{\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{control}}^{\text{negative}}}{\text{OD}_{\text{control}}^{\text{positive}} - \text{OD}_{\text{control}}^{\text{negative}}} \times 100\%$$

Результаты. Образцы диатомита «ГДА ВАК КТРЛ»; «ЧДА ВАК КТРЛ» и «ЧДА ВАК СВ6» показали наибольшие уровни гемолиза во всей экспериментальной выборке. Уровни гемолиза остальных образцов не отличаются от отрицательного контроля ($p > 0,05$). Уровни гемолиза данных образцов статистически значимо отличались от отрицательного контроля и составляли 5,8711 % ($p < 0,01$); 12,9832 % ($p < 0,001$) и 1,7747 % ($p < 0,01$) соответственно. При этом уровень гемолиза образца «ЧДА ВАК КТРЛ» значительно превышал таковой у остальных образцов.

Заключение. Установлено, что повышенным уровнем гемолиза отличаются образцы, подвергнутые вакуумной обработке. Остальные типы обработки не оказывали значительного влияния на гемосовместимость. Можно предположить, что при этом меняются структурные свойства поверхности, что понижает гемосовместимость. Уровень гемолиза биоматериалов должен быть более 5 % [3]. Модификация поверхности скаффолдов кукурбит[6]урилом достоверно усилила гемолитическую активность, но крайне незначительно, что в дальнейшем позволит использовать это соединение для дальнейших исследований по модификации поверхности и придания материалам биоподобия.

До сих пор остается нерешенной проблема нежелательного свертывания крови при контакте с имплантируемыми материалами и устройствами [4].

Причиной данной проблемы является то, что здоровый эндотелий сосудов имеет механизмы, противостоящие тромбообразованию, а чужеродные для организма материалы не имеют таких защитных механизмов. Вместо этого биоматериалы способствуют свертыванию крови через активацию ряда взаимосвязанных процессов, которые включают адсорбцию белков, адгезию тромбоцитов и лейкоцитов, выработку тромбина и активацию комплемента [4]. Вероятно, что очищение диатомита химическим способом увеличивает его связываемость с белками плазмы, что, как следствие, увеличивает и гемолиз.

Исследование выполнено при поддержке Программы развития Томского государственного университета (Приоритет-2030).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wolff, A. (2006) Diatomaceous earth. In: Britannica Concise Encyclopedia. – Encyclopedia Britannica.
2. Das D., Assaf K.I., Nau W.M. Applications of Cucurbiturils in Medicinal Chemistry and Chemical Biology // Front. Chem. – 2019. – V. 7. – P. 1-23.
3. ГОСТ ISO 10993-4-2020 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследования изделий, взаимодействующих с кровью – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 39 С.
4. Maitz F., Martins C., Grabow N. [et al.] The blood compatibility challenge. Part 4: Surface modification for hemocompatible materials: Passive and active approaches to guide blood-material interactions // Acta Biomaterialia. – 2019. – V. 94. – P. 33-43.

УДК 617.713-089.843

**ВЛИЯНИЕ НА ТЕЧЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННОЙ *IN VIVO* БУЛЛЕЗНОЙ КЕРАТОПАТИИ
ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ**

Е.О. Филиппова

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050

E-mail: katerinabosix@mail.ru

**POLYLACTIC ACID EFFECT ON THE COURSE OF *IN VIVO*-INDUCED BULLOUS
KERATOPATHY**

E.O. Filippova

Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050

E-mail: katerinabosix@mail.ru

Abstract. *The purpose of the study is to evaluate the effect of polylactic acid on the course of bullous keratopathy induced in vivo. Results showed that the induced bullous keratopathy in animals with polylactic acid films implanted in the anterior chamber of the eye proceeds with the manifestation of mild leukocyte infiltration in the proper substance of the cornea.*

Введение. В настоящее время одним из перспективным направлений в лечении тяжелого, прогрессирующего заболевания – буллезной кератопатии [1] – является использование полимерных пленок как имплантатов в барьерной кератопластике. Полимолочная кислота широко распространена в медицинских приложениях: для тканевой инженерии [2], в качестве подложек, микросфер и скэффолдов для доставки и высвобождения лекарств [3], а также для производства нитей и штифтов [4]. Дegradaция указанного полимера *in vitro* в основном происходит путем гидролитического расщепления, а в *in vivo* важную роль играют ферменты в иницировании процесса деградации. Продукты разложения полимолочной кислоты являются нетоксичными и удаляются в виде CO₂ и воды по циклу Кребса [5]. Хотя изделия из биodeградируемых материалов, в том числе из полимолочной кислоты, имеют чаще форму микросфер [6], стержней и скэффолдов [7], использование тонких пленок может иметь больший интерес в офтальмологии для создания роговичного имплантата.

Цель исследования – оценить влияние полимолочной кислоты на течение индуцированной *in vivo* буллезной кератопатии.

Экспериментальная часть. Эксперименты *in vivo* были выполнены на 14 кроликах породы *Sylvilagus bachmani* массой 2,5-3,0 кг. Эксперименты одобрены локальным Этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (протокол № 7892 от 13.05.2019 г).

В условиях операционной под наркозом 12 животным после обработки операционного поля с соблюдением правил асептики и антисептики моделировали буллезную кератопатию путем механического повреждения и удаления эндотелия роговицы одного из глаз. Спустя 2 недели после повреждения роговой оболочки и развития заболевания животные были поделены на следующие группы:

1 группа – интактная группа (2 кролика, 4 глаза) служила контролем.

2 группа – группа модели заболевания – животные с воспроизведением на первом этапе буллезной кератопатии (4 кролика, 4 глаза).

3 группа – группа сравнения – животные с индуцированной буллезной кератопатией (4 кролика, 4 глаза), которым проводили консервативное лечение в виде инстилляций 0,3 % раствора Тобрекса по 1 капле 4 раза в день, препарата 0,01 % Баларпана по 1 капле 3 раза в день, закладывания 5 % Корнерегеля за нижнее веко по 4 раза в день.

4 группа – основная группа – животные с индуцированной буллезной кератопатией (4 кролика, 4 глаза), которым осуществляли имплантацию пленок полимолочной кислоты диаметром 8,0 мм в переднюю камеру глаза с последующим подшиванием к роговице. Образцы пленок полимолочной кислоты были сформированы из 1 % -го раствора полимолочной кислоты с молекулярным весом, $M_w=121$ кДа (PURASORB® PL 10, Нидерланды) в хлороформе ($CHCl_3$) (Экрос, Россия). Для устранения остаточного растворителя пленки выдерживали в вакуумной камере в течение 24 часов (давление 10^{-3} Торр, температура 25 °C). В послеоперационном периоде экспериментальным животным закапывали растворы Тобрекса по 1 капле 4 раза в день, препарата 0,01% Баларпана по 1 капле 3 раза в день, закладывания 5 % Корнерегеля за нижнее веко по 4 раза в день.

Выведенных из эксперимента животным выполняли энуклеацию, полученный материал фиксировали для световой микроскопии. Полученные в ходе гистологического исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином, и по методу Ван-Гизона. Подсчет удельного объема сосудов, клеток, щелей между коллагеновыми волокнами осуществлялся при помощи окулярной сетки Автандилова на 50 точек (=100 %), для чего в десяти независимых полях зрения определялось количество определяемых структур, попадающих на строму, вычислялся удельный объем (%).

Для статистического анализа полученных результатов исследований применялся статистический пакет IBM SPSS Statistics 20 с вычислением медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q_1-Q_3). Для оценки различий использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. По данным световой микроскопии у животных второй группы – с индуцированной буллезной кератопатией – отмечались характерные для рассматриваемого заболевания изменения. В переднем эпителии толщиной $50,4 \pm 5,4$ мкм обнаруживались дистрофически измененные эпителиоциты – $23,4 \pm 3$ клеток в поле зрения. Передняя пограничная мембрана была неравномерна по своей толщине. Коллагеновые волокна собственного вещества роговицы местами гидратированы, с повышенно извитым ходом, между ними обнаруживались пространства удельным объемом $30,4 \pm 5,3$ %, которые можно расценить как наличие отека в строме роговой оболочки. Задняя пограничная мембрана утолщена, эндотелий отсутствовал. Местами, спустя месяц после индуцирования заболевания, обнаруживались новообразованные сосуды в собственном веществе роговицы, удельным объемом $5,6 \pm 3,2$ %.

У животных четвертой группы по данным световой микроскопии спустя месяц после имплантации передний эпителий толщиной $32,2 \pm 4,6$ мкм представлял собой пласт эпителиоцитов, $p < 0,05$. Собственное вещество роговицы представлено коллагеновыми волокнами, между которыми визуализировались пространства-щели удельным объемом $22,1 \pm 3,7$ %, что на 8 % меньше значения

второй группы. Местами встречались тонкостенные сосуды удельным объемом $6,8 \pm 2,5$ %, $p > 0,05$. Ближе к задней пограничной мембране наблюдалась лейкоцитарная инфильтрация, удельным объемом 3 %.

У животных третьей группы по данным световой микроскопии спустя месяц от начала лечения толщина переднего эпителия составила $38,5 \pm 5,9$ мкм, что на 11,9 % меньше значения второй группы ($p > 0,05$) и 6,3 % больше четвертой ($p > 0,05$). В собственном веществе коллагеновые волокна имели умеренно повышенный извитой ход, удельный объем щелей между ними составил $28,3 \pm 6,4$ %, $p > 0,05$. Как и во второй и четвертой группе, в строме роговицы третьей группы встречались новообразованные сосуды удельным объемом $5,1 \pm 3,3$ %, $p > 0,05$.

Заключение. Индуцированная буллезная кератопатия у животных с имплантированной в переднюю камеру глаза пленок полимолочной кислоты протекает с проявлением слабовыраженной лейкоцитарной инфильтрацией в собственном веществе роговицы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heeren T., Holz F. G., Löffler K. U. Bullous keratopathy // *Ophthalmology*. – 2013. – V. 110. – P. 1069-1072.
2. Lopes M.S., Jardini A.L., Maciel Filho R. Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications // *Procedia Engineering*. – 2012. – V. 42. – P. 1402-1413.
3. Iesavand H., Rahmati M., Afzali D., Modir S. Investigation on absorption and release of mercaptopurine anticancer drug from modified polylactic acid as polymer carrier by molecular dynamic simulation // *Materials Science and Engineering: C*. – 2019. – V. 105. – P. 110010.
4. Pawar P.R, Tekale S.U., Shisodia S.U., Totre J.T., Domb A.J. Biomedical Applications of Poly (Lactic Acid) // *Recent Patents on Regenerative Medicine*. – 2014. – V. 4 (1). – P. 40-51.
5. Yasukawa T., Ogura Y., Sakurai E., Tabata Y., Kimura H. Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices // *Advanced drug delivery reviews*. – 2005. – V. 57 (14). – P. 2033-2046.
6. Giordano G.G., Chevez-Barrios P., Refojo M.F., Garcia C.A. Biodegradation and tissue reaction to intravitreal biodegradable poly (D,L-lactico- glycolic) acid microspheres // *Current eye research*. – 1995. – V. 14 (9). – P. 761-768.
7. Rubsamen P. E., Davis P. A., Hernandez E., O'Grady G. E., Cousins S. W. Prevention of experimental proliferative vitreoretinopathy with a biodegradable intravitreal implant for the sustained release of fluorouracil // *Archives of ophthalmology*. – 1994. – V. 112 (3). – P. 407-413.

УДК 616-006.66

**БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, АНАЛОГИ МЕТОЗОЛОМИДА,
КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ДЛЯ ХИМИОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ
НОВООБРАЗОВАНИЙ**

А.Х. Хумаири

Научные руководители: член-корр. РАН В.В. Удут, профессор, д.м.н., Д.Л. Сперанский

Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России,

Россия, г. Волгоград, пр. Павших Борцов, 1, 400313

E-mail: ahmed.h.mneahil@gmail.com**BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS, ANALOGUES OF METOZOLOMIDE,
AS PROMISING SOURCES FOR CHEMOTHERAPY OF MALIGNANT NEOPLASMS**

А.Н. Al-Humairi

Scientific Supervisors: Corr Mem., V.V. Udut, Prof., Dr., D.L. Speransky

Vologograd State Medical University, Russia, Volgograd, Fallen Fighters ave., 1, 400313

E-mail: ahmed.h.mneahil@gmail.com

Abstract. *The work is devoted to the determination of the antitumor activity of new analogues of mitozolomide in order to establish the potential possibility, of their use in medicine as antitumor agents, including for chemotherapy of metastatic breast cancer. The relevance of the work is due to the widespread spread of oncological diseases and high mortality from them, Epirubicin, widely used in breast cancer chemotherapy, was used as a comparison drug. According to the results of the study, the absolute leader is the derivative.*

Введение. Онкологические заболевания являются одной из главных причин смерти людей в мире. Рак молочной железы (РМЖ) относится к наиболее частым и опасным видам рака у женщин. По данным ВОЗ, в мире от рака каждый год умирает около 8 миллионов человек [1]. Противоопухолевые препараты недостаточно хорошо работают, высоко токсичны. Это ведет к поиску новых путей лечения данной патологии [2]. Одним из представителей препаратов алкилирующего действия является метозоломид, который используется в химиотерапии ряда злокачественных новообразований. Однако его широкое использование снижается в связи с его нестабильной химической структурой при назначении. К настоящему моменту синтезированы разнообразные производные метозоломида в качестве противоопухолевых средств со стабильной химической структурой [3]. Цель исследования: изучить цитотоксическую активность новых соединений, являющихся аналогами метозоломида на опухолевой клеточной линии MCF-7.

Экспериментальная часть. Для оценки потенциальных противоопухолевых свойств были использованы новые производные, которые являются аналогами метозоломида: 3-Циклогексил-4-оксоимидазо[5,1-*d*]-[1,2,3,5] тетразин-8-*N*-пиперидинил-карбоксамид (соединение 1), диэтиловый эфир 4-аминоимидазо[5,1-*c*][1,2,4]триазин-3,8-дикарбоновой кислоты (соединение 2), 4-Амино-8-этоксикарбонил-имидазо[5,1-*c*][1,2,4]триазин-3-*N*-(*p*-толуил)карбоксамид (соединение 3). Способы получения, химические структуры, а также чистота исследуемых соединений были ранее опубликованы [3] и предоставлены

сотрудниками Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина для тестирования их цитотоксического действия. Препаратом сравнения являлся эпирубицин.

В качестве клеточной модели была использована опухолевая клеточная линия рака молочной железы – MCF-7, которая является самой популярной линией для исследования цитотоксичности противоопухолевых соединений и молекулярных особенностей протекания рака молочной железы. MCF-7 культивировали согласно стандартному протоколу. Исследуемые вещества использовали в концентрациях – 0,25; 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 мкмоль/л. Планшет с внесенными соединениями помещали на 1 ч в CO₂-инкубатор. Для выявления жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест. Выживаемость клеток рассчитывали по формуле:

$$(\text{ОП}_{\text{опыт}} - \text{ОП}_{\text{среды}}) / (\text{ОП}_{\text{контр}} - \text{ОП}_{\text{среды}}) * 100 \%,$$

где ОП_{опыт} – среднее значение оптической плотности в лунках опытной группы; ОП_{среда} – среднее значение оптической плотности в лунках со средой; ОП_{контр} – среднее значение оптической плотности в лунках контрольной группы.

Определяли концентрацию тестируемого соединения, при которой наступало максимальное подавление жизнеспособности клеток от контроля. Концентрацию вещества, которая вызывает 50 % гибель клеток (IC₅₀), рассчитывали графически по дозозависимой кривой с помощью программного обеспечения Origin (OriginLabCorporation).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 («Dell» США). С учетом отсутствия нормального распределения в выборках по критерию Шапиро-Уилка результаты представляли, как Me (Q1; Q3). Внутригрупповой сравнительный анализ проводился по критерию Краскела-Уоллиса (непараметрический вариант ANOVA) с последующими множественными сравнениями по Бонферрони-Данну. Сравнение между группами – по критерию Манна-Уитни. Различия считали значимыми при уровне доверительной вероятности $p < 0,05$.

Результаты. Исследование показало, что выраженный цитотоксический эффект эпирубина приходится только на его максимальную концентрацию. Использование препарата сравнения – эпирубина привело к низкой противоопухолевой активности (IC₅₀ – 9,37 мкмоль/л, С_{к/Смах} – 2,10) (табл. 1). Эти и последующие дозы не сопоставимы с теми, что применяются в практике при лечении злокачественных новообразований. Связано это с тем, что вещество имеет преимущественно цитостатическую активность через воздействие на генетический материал клетки, не затрагивая мембрану, что и являлось бы признаком прямой цитотоксичности [4].

При проведении оценки цитотоксичности *in vitro* в культуре клеток рака молочной железы человека MCF-7 трех новых аналогов метозоломида показано, что использование соединения 1 (IC₅₀ – 0,85 мкмоль/л, С_{к/Смах} – 7,34) оказало высокую ингибирующую активность в отношении опухолевых клеток. Умеренным цитотоксическим действием обладает соединение 2 (IC₅₀ – 2,98 мкмоль/л, С_{к/Смах} – 4,02) и соединение 3 (IC₅₀ – 5,05 мкмоль/л, С_{к/Смах} – 3,95) (табл.1). Цитотоксическое действие всех исследуемых соединений было выше эпирубина. Возможные механизмы доказательства их различий в эффективности, а также сопоставление со структурными особенностями данных молекул требуют отдельного экспериментального исследования.

Механизмом противоопухолевого действия изучаемых соединений может являться их способность индуцировать апоптоз опухолевых клеток через повреждение ДНК по средствам

метилирования в N⁷ и O⁶ гуанина и N³ аденина. При возникшем повреждении в ДНК встраивается тимидин вместо цитозина [5].

Таблица 1

Цитотоксическая активность новых производных азолотриазина в культуре клеток рака молочной железы человека MCF-7

Тестируемое соединение	Максимальное подавление		Расчетная концентрация половинного торможения IC ₅₀ , мкмоль/л
	Концентрация, мкмоль/л	Ск/Сmax	
Соединение 1	10,0	7,34* [7,09 ÷ 8,20]	0,85
Соединение 3	10,0	4,02* [3,79 ÷ 4,39]	2,98
Соединение 3	5,0	3,95* [3,70 ÷ 4,25]	5,05
Эпирубицин (препарат сравнения)	10,0	2,10 [1,97 ÷ 2,33]	9,37

Примечание: знаком «*» отмечены достоверные различия с величинами показателя при использовании препарата сравнения эпирубина.

Заключение. Результаты проведенного исследования позволяют сделать заключение о перспективности проведения дальнейших доклинических испытаний определения противоопухолевой эффективности и безопасности новых соединений 1, 2, 3 с целью создания на их основе новых цитостатических препаратов для терапии пациенток с раком молочной железы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rositch A.F., Unger-saldana K., Deboer R.J. et al. The role of dissemination and implementation science in global breast cancer control programs: frameworks, methods, and examples // *Cancer*. – 2020. – Vol. 26(10) – P. 2394-2404.
2. Longacre M., Snyder N.A., Housman G. et al. A comparative analysis of genetic and epigenetic events of breast and ovarian cancer related to tumorigenesis // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17(5). – P. e759.
3. Садчикова Е.В. Синтез новых азоло [5, 1-d][1, 2, 3, 5] тетразин-4онов-аналогов противоопухолевого препарата темозоломид // *Известия академии наук. Серия химическая*. – 2016. – №7. – С. 1867-1872.
4. Zhang K.-P., Fang X., Zhang Y., Chao. M. The prognosis of cancer patients undergoing liposomal doxorubicin-based chemotherapy: A systematic review and meta-analysis // *Medicine (Baltimore)*. – 2021. – Vol. 100(34) – P. e26690.
5. Ramis G., Thomas-Moya E., de Mattos S.F. et al. EGFR inhibition in glioma cells modulates rho signaling to inhibit cell motility and invasion and cooperates with temozolomide to reduce cell growth // *PLoS One*. – 2012 – Vol. 7. – P. e38770.

УДК 616-006-08:615.28:576.38

**МЕХАНИЗМЫ ВЫХОДА ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
ИЗ ПОСТХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ШОКА**

И.А. Цыденова^{1,2}, Д.С. Долгашева^{1,2}, К.А. Гаптулбарова^{1,2}

Научный руководитель: профессор, д.б.н., Н.В. Литвяков

¹НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр,
Россия, г.Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

²Национальный исследовательский Томский государственный университет
Россия, г.Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: tsydenova422@gmail.com

**EXIT MECHANISMS OF DIFFERENTIATED TUMOUR CELLS
FROM POST-CHEMOTHERAPY SHOCK**

I.A. Tsydenova^{1,2}, D.S. Dolgasheva^{1,2}, K.A. Gaptulbarova^{1,2}

Scientific Supervisor: Prof., Dr., N.V. Litviakov

¹Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634009

²Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: tsydenova422@gmail.com

Abstract. *In breast cancer, tumour cells after neoadjuvant chemotherapy (NAC) leave post-chemotherapy shock and form macrometastases in 25% of patients. In breast cancer patients, it has been shown that emergence from post-chemotherapy shock with metastasis is observed only in those patients whose tumours have ectopically activated WNT signalling due to gene amplifications of activators and deletions of negative regulators of this signalling pathway. Aim: In a direct experiment on cell cultures differing in ectopic activation of WNT signalling due to CNA (Copy Number Aberration) of WNT signalling genes, to study the ability of tumour cells to emerge from post chemotherapy shock.*

Введение. Опухолевые клетки (как первичной опухоли, так и микрометастазов) при старении перестают делиться, в них угнетается синтез РНК, и в этот период они либо восстанавливаются от повреждений и выходят из состояния старения, либо погибают. Несмотря на общепринятое мнение, что клеточное старение действует как механизм подавления опухоли, особенно у молодых организмов, за последние десятилетия появилось все больше доказательств того, что стареющие клетки вовлечены в прогрессирование рака [1]. И хотя опухолевые клетки не имеют пределов репликации, как нормальные клетки, многие из них все еще сохраняют способность к старению, особенно после воздействия агентов, повреждающих ДНК. Одним из таких агентов является цисплатин (ЛЭНС), который соединяется с реактивным центром N7 на пуриновых основаниях, что вызывает повреждение ДНК, которое блокирует репликативный механизм и направляет опухолевые клетки к апоптозу [2]. Предполагается, что выраженное кратковременное повреждение ДНК активирует апоптоз, тогда как длительное слабое повреждение ДНК вызывает клеточное старение. Таким образом, ошибочно считать, что старение считается «эволюционным тупиком» для клеток. Ранее нами было показано, что у 50 % больных раком

молочной железы после проведения неoadъювантной химиотерапии (НХТ), у которых опухолевые клетки имеют амплификации генов стволовости и обладают способностью к дедифференцировке, не образуются метастазы. Мы проанализировали состояние WNT-сигналинга у этих пациентов и обнаружили, что метастазы образуются только у тех пациентов, у которых WNT-сигналинга находится в потенциально активированном состоянии за счет амплификаций генов активаторов и/или делеций генов негативных регуляторов генов WNT-сигналинга. Всего нами идентифицировано 15 генов активаторов WNT-сигналинга (WNT2B, SKP1, TCF7, PPP2CA, WNT8A, MAPK9, CCND3, PPP2R5D, WNT8B, CCND1, FZD2, WNT3, FZD9, WNT3, WNT9B) и 7 генов негативных регуляторов (GSK3B, APC, CSNK2B, SFRP5, BTRC, TCF7L2, CSNK2A2), амплификации и делеции которых (соответственно) должны стимулировать WNT-сигнальный путь [1].

Таким образом, целью данной работы – доказать или опровергнуть начальную гипотезу о том, что состояние CNA-активации генов WNT-сигналинга (амплификации активаторов и делеции негативных регуляторов) обуславливает способность дифференцированных опухолевых клеток выходить из состояния постхимиотерапевтического шока.

Экспериментальная часть. Использовали две линии опухолевых клеток, которые согласно нашей балльной системе после проведения CNA-анализа имели разные уровни эктопической экспрессии WNT-сигналинга: T47D с высоким уровнем (FZD9-Gain +1, TSF7L2-Loss +1, CCND1-Gain +1, CSNK2A2-Loss +1, FZD2-Gain +1, WNT3-Gain +1, WNT9B-Gain +1 в сумме 7) и Bt474 с нормальным уровнем активации WNT-сигналинга (GSK3B-Gain -1, FZD9-Gain +1, TSF7L2-Gain -1, CCND1-Gain +1, в сумме 0). Клетки культивировали в среде DMEM при стандартных условиях 37°C, CO₂ – 5 %. Выделение дифференцированных клеточных популяций CD44-/CD24+ проводили с помощью сортера Sony SH800S (Sony Biotechnology, США). К популяции клеток CD44-/CD24+ линий T47D и Bt474 после клеточной сортировки через 48 часов добавляли препараты. В контрольную лунку добавляли ростовую среду RPMI-1610. IL6 добавляли в конечной концентрации 50 нг, цисплатин – 25 μM, а ингибитор WNT-сигналинга ICG-001 в конечной концентрации 1 μM и ДМСО 3 % от объема среды добавляли через 72 часа. Динамику роста культуры и формирование маммосфер фиксировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Изображения анализировали с помощью программного обеспечения NIS-Elements. Определяли клеточность культур, ареал закрытия дна лунки и наличие маммосфер. Клетки использовали в дальнейшем для транскриптомного анализа на экспрессионных чипах фирмы Affymetrix (USA) Clariom™ S Pico Assay.

Результаты. В качестве химиопрепарата был использован цисплатин (ЛЭНС), один из часто назначаемых препаратов у больных раком молочной железы, особенно если у них есть герминальные мутации гена BRCA1. Для проведения дальнейших экспериментов была выбрана доза цисплатина 25 μM, которая, в соответствии с расчетами, по результатам эксперимента (МТТ-тест) давала 30% гибель клеток этих линий. Без воздействия цисплатина культуры T47D и Bt-474 принципиально не отличаются, чуть отстает рост культуры Bt-474, но также, как и в культуре дифференцированных CD44-CD24+ клетках T47D происходит дедифференцировка до стволовых CD44+CD24- с образованием маммосфер. После воздействия цисплатина на субпопуляции EpCAM+CD44-CD24-/+ клеток опухолевых линий Bt474 и T47D динамика клеточности культур существенным образом различается. Клеточность Bt474 снижается на протяжении всего наблюдения, и на 21 сутки культивирования оказываются мертвыми практически

все клетки. В то время как в контроле, без цисплатина, клеточность увеличивалась и образовывались опухолевые стволовые клетки, о чем свидетельствовало наличие сфероидов.

Эти данные показывают, что клетки Vt474 с нормальным уровнем WNT-сигналинга не выходят из старения после воздействия цисплатина. Клетки линии T47D с эктопической активацией WNT-сигналинга, после воздействия цисплатина выходили на 14 сутки из состояния старения, и к 21 суткам клеточность культур существенно возрастала, и образовывались маммосферы. Совместное воздействие цисплатина и ингибитора приводит к тому, что на 21 сутки практически все клетки этой линии погибали, в то время как один ингибитор не препятствовал пролиферации и образованию маммосфер. Действие ингибитора WNT ICG-001 подтверждалось транскриптомным анализом, и экспрессия 122/170 генов WNT-сигналинга оказывается сниженной более чем в 2 раза по сравнению с клетками без воздействия ICG-001.

Заключение. Наши исследования механистически доказывают начальную гипотезу, высказанную ранее [3] о том, что выход дифференцированных опухолевых клеток из посхимиотерапевтического шока в процессе химиотерапии обусловлен с одной стороны наличием в опухолевых клетках амплификаций генов стволовости (необходимое условие), а с другой стороны эктопической активацией WNT-сигналинга (достаточное условие). Без эктопической активации WNT-сигналинга опухолевые клетки, подвергшиеся воздействию химиопрепаратов не способны выходить из посхимиотерапевтического шока.

Работа поддержана Грантом РФФ № 21-15-00243.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions // *Cancer Discovery*. – 2022. – V. 12(1). – P. 31-46.
2. Miłkula-Pietrasik J., Witucka A., Pakuła M., Uruski P., Begier-Krasińska B., Niklas A., Tykarski A., Książek K. Comprehensive review on how platinum-and taxane-based chemotherapy of ovarian cancer affects biology of normal cells // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2019. – V. 76(4). – P. 681-97.
3. Amplifications of stemness genes and the capacity of breast tumors for metastasis // *Oncotarget*. – 2020. – V. 11. – P. 1988-2001.

УДК 616-092.9

**ВЗАИМОСВЯЗЬ ФАКТОРОВ ОЖИРЕНИЯ И БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ
ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ**Н.А. Чернышов, Е.А. Мотлохова, Ю.Г. Бирулина

Научный руководитель: д.м.н., О.В. Воронкова

Сибирский государственный медицинский университет,

Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050

E-mail: voronkova-ov@yandex.ru**RELATIONSHIP FACTORS OF OBESITY AND BRONCHOPULMONARY PATHOLOGY
IN METABOLIC SYNDROME**N.A. Chernyshov, E.A. Motlokhova, Yu.G. Birulina

Scientific Supervisor: Dr., O.V. Voronkova

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow trakt str., 2, 634050

E-mail: voronkova-ov@yandex.ru

Abstract. *The influence of obesity factors on the formation of bronchopulmonary pathology of rats with experimental metabolic syndrome (MS) was studied. The MS model was carried out on male Wistar rats using a high-fat, high-carbohydrate diet (HFHCD). It was found that HFHCD led to an increase in body weight, visceral obesity, hyperglycemia, insulin resistance, leptinemia, hypoadiponectinemia, dyslipidemia in rats of the experimental group. An increase in the content of protein and IL-6 was found in the bronchoalveolar lavage fluid of experimental animals, which positively correlated with the level of leptin and the mass of adipose tissue. A histological examination of adipose tissue in rats of an experimental group revealed signs of hypertrophy and hyperplasia of adipocytes.*

Введение. Хронические неинфекционные респираторные заболевания представляют собой актуальную медико-социальную проблему вследствие высокой заболеваемости и ранней инвалидизации пациентов [1]. В качестве факторов риска развития бронхолегочной патологии рассматриваются избыточная масса тела и алиментарное ожирение [2]. Современные исследования показывают, что хроническое воспаление в жировой ткани связано с развитием гиперреактивности воздухоносных путей и может являться причиной респираторной патологии [3, 4]. Поскольку патологический процесс в бронхолегочной системе формируется медленно, и клинические проявления дыхательной недостаточности значительно отсрочены, исследование патогенеза нарушений функции дыхания у пациентов с ожирением представляется затруднительным. Поэтому особый интерес представляет использование биологических моделей [5]. В связи с этим, целью исследования явилось изучение влияния ожирения на формирование бронхолегочной патологии при экспериментальном MS.

Экспериментальная часть. Модель MS была воспроизведена на крысах Wistar (33 самца, возраст на начало исследования 6 недель). Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заключение № 8201 от 27.03.2020 г.). Животные были распределены на контрольную (n = 15) и экспериментальную (n = 18) группы. Крысы контрольной группы получали

стандартный корм («Дельта Фидс», Биопро, РФ) со свободным доступом к пище и воде. Крысы экспериментальной группы в течение 12 недель находились на высокожировой и высокоуглеводной диете (ВЖВУД) с заменой питьевой воды на 20 % раствор фруктозы. В конце эксперимента животных подвергали CO₂-этаназии. Выполняли забор крови из сердца для получения сыворотки. Извлекали висцеральную жировую ткань, комплекс сердце-легкие. Открытым способом на изолированном комплексе сердце-легкие выполняли бронхоальвеолярный лаваж [6]. В лаважной жидкости определяли концентрацию белка спектрофотометрически (BCA Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich, США) и цитокинов IL-6, IL-10 иммуноферментным методом (наборы ABclonal Biotechnology Co., Ltd, КНР). В сыворотке крови определяли концентрацию глюкозы (Glucose-TR, Chronolab, Испания), триацилглицеридов, холестерина (наборы Triglycerides, Cholesterol, Chronolab, Испания, соответственно) колориметрическим методом, инсулина (Insulin Rat ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, США), лептина (Rat Leptin ELISA Kit, ELK Biotechnology, КНР) и адипонектина (Rat ADP (Adiponectin) ELISA Kit, ELK Biotechnology, КНР) иммуноферментным методом. Индекс НОМА-IR рассчитывали как (сывороточный инсулин)×(сывороточная глюкоза)/22,5. Для оценки наличия структурных изменений в жировой ткани у крыс контрольной и опытной групп, выполняли гистологическое исследование. Подготовленные срезы окрашивали гематоксилином Джилла (BioVitrum, РФ) и эозином (BioVitrum, РФ). Статистическую обработку данных проводили в программе SPSS Statistics 23. Данные, подчиняющиеся нормальному закону распределения, представлены в виде среднего (M) и стандартного отклонения (\pm SD), неподчиняющиеся – медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (Q25; Q75). Анализ различий между выборками выполняли при помощи t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки взаимосвязи между показателями определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты. У животных, находившихся в течение 12 недель на ВЖВУД, происходило увеличение массы тела, удельной массы висцеральной жировой ткани. ВЖВУД способствовала повышению уровня глюкозы, инсулина и лептина, но снижению адипонектина в сыворотке крови крыс опытной группы (таблица 1). Увеличение концентрации лептина в крови животных опытной группы положительно коррелировало с уровнем глюкозы ($r = 0,623$, $p < 0,001$), массой тела ($r = 0,574$, $p = 0,005$) и массой абдоминального жира ($r = 0,552$, $p = 0,022$). У крыс опытной группы также наблюдалось увеличение содержания в сыворотке крови триацилглицеридов и холестерина (таблица 1).

Таблица 1

Физиологические и биохимические показатели у крыс при экспериментальном МС

Параметр	Группа	
	Контрольная (n = 15)	Опытная (n = 18)
Масса тела, г	433,3 \pm 39,4	489,1 \pm 47,9*
Удельная масса жировой ткани, г	2,2 \pm 0,2	4,3 \pm 0,6*
Глюкоза натощак, ммоль/л	4,7 \pm 0,5	6,6 \pm 0,4*
Инсулин, пмоль/л	11,2 \pm 0,8	24,2 \pm 5,6*
НОМА-IR	0,4 \pm 0,1	1,3 \pm 0,4*
Лептин, нг/мл	3,1 \pm 0,3	4,5 \pm 0,1*
Адипонектин, нг/мл	5,8 \pm 2,3	4,1 \pm 0,6*
Холестерол, ммоль/л	1,7 \pm 0,2	2,3 \pm 0,3*
Триацилглицеролы, ммоль/л	0,7 \pm 0,2	1,7 \pm 0,5*

* - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

При гистологическом исследовании срезов жировой ткани установлено, что у крыс опытной группы на фоне нарушения кровообращения присутствовали признаки гипертрофии и гиперплазии жировых клеток. Исследование полученной БАЛЖ позволило выявить увеличение концентрации белка в 1,5 раза у крыс опытной группы по сравнению с параметрами группы контроля. Также у животных опытной группы было обнаружено статистически значимое повышение концентрации IL-6 в лаважной жидкости, тогда как уровень IL-10 не различался между исследуемыми группами (таблица 2). Была установлена положительная корреляция между уровнем лептина в сыворотке крови и концентрацией белка ($r = 0,355$, $p = 0,020$) и IL-6 ($r = 0,573$, $p = 0,005$), а также массой жировой ткани и уровнем IL-6 ($r = 0,486$, $p = 0,005$) в лаважной жидкости.

Таблица 2

Концентрация белка и цитокинов в БАЛЖ у крыс при экспериментальном МС

Параметр	Группа	
	Контрольная (n = 15)	Опытная (n = 18)
Общий белок, г/л	0,7±0,2	1,1±0,3*
IL-6, пг/мл	5,3 (4,7; 9,2)	9,7 (9,4;15,7)*
IL-10, пг/мл	59,9 (37,4; 74,5)	66,1 (38,4; 85,9)

* - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Заключение. Избыточная масса тела и ожирение являются ключевыми факторами для возникновения множества морфофункциональных нарушений в различных органах и тканях, в том числе, в бронхолегочной системе. В данной работе показано, что ожирение, вызванное ВЖВУД, способствует формированию локального воспаления в бронхолегочной системе, что, вероятно, может способствовать повышению реактивности воздухоносных путей экспериментальных животных. Учитывая тесную взаимосвязь ожирения и бронхолегочной дисфункции, необходимо углубленное изучение ее патогенеза с целью совершенствования способов профилактики и тактики лечения бронхообструктивных заболеваний у лиц с избыточной массой тела и ожирением.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (МК-3302.2022.1.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Будневский А.В. Сочетание хронической обструктивной болезни легких и метаболического синдрома: патофизиологические и клинические особенности // Терапевтический архив. – 2017. – № 89(1). – С. 123-127.
2. Mafort T.T. et al. Obesity: systemic and pulmonary complications, biochemical abnormalities, and impairment of lung function // Multidiscip. Respir. Med. – 2016. – Vol. 11. – P. 28.
3. Karczewski J. et al. Obesity and inflammation // Eur. Cytokine Netw. – 2018. – Vol. 29(3). – P. 83-94.
4. Luthe S.K. et al. Association Between Obesity and Acute Severity Among Patients Hospitalized for Asthma Exacerbation // J. Allergy Clin. Immunol. Pract. – 2018. – Vol. 6(6). – P. 1936-1941.
5. Silva F.M.C. Obesity promotes prolonged ovalbumin-induced airway inflammation modulating T helper type 1 (Th1), Th2 and Th17 immune responses in BALB/c mice // Clin. Exp. Immunol. – 2017. – V. 189(1). – P. 47-59.
6. Матичин А.А. Особенности отбора бронхоальвеолярного лаважа у лабораторных животных // Лабораторные животные для научных исследований. – 2019. – № 4. – С. 6.

УДК 575.1

**БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ГЕНОМНОГО КОНТЕКСТА
НА НАРУШЕНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ
БЕРЕМЕННОСТИ**

Д.Г. Шевцов^{1,2}, О.Ю. Васильева¹, С.А. Филатова^{1,2}

Научный руководитель: д.б.н., С.А. Васильев^{1,2}

¹НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр,
Россия, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10, 634050

²Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: danilka.danii@mail.ru

**BIOINFORMATIC ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF GENOMIC CONTEXT
ON DNA METHYLATION DISORDERS IN THE PLACENTA IN PREGNANCY PATHOLOGIES**

D.G. Shevtsov^{1,2}, O.Yu. Vasilyeva¹, S.A. Filatova^{1,2}

Scientific supervisor: Dr., S.A. Vasilyev^{1,2}

¹Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Nab. r. Ushayki, 10, 634050

²Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: danilka.danii@mail.ru

Abstract. *The aim of this study is to evaluate the effect of genomic context on DNA methylation disorders in chorionic villi of spontaneous abortions of the first trimester of pregnancy with X-chromosome monosomy. The data on which the analysis was performed were obtained using the reduced representation bisulfite sequencing (RRBS). Chorionic trophoblast cells from spontaneous abortions with monosomy X with an X chromosome of maternal origin (matX, n=4) and an X chromosome of paternal origin (patX, n=4) were used as samples. Induced abortions were used as a control group (n=7). Significant differences were found in the DNA methylation profile in spontaneous abortions with monosomy X from induced abortions in the direction of both hypo- and hypermethylation. In spontaneous abortions with monosomy X, an increase in differential DNA methylation in the regions of retrotransposons, LAD and subtelomeric regions was found, as well as the presence of a positive correlation between the percentage of GC and the density of differential DNA methylation in genome regions.*

Введение. Метилирование ДНК (5-метилцитозин) является основной формой модификации ДНК в геноме млекопитающих. В целом, метилирование ДНК стабильно поддерживается в соматических тканях. [1]. Метилирование может вносить существенный вклад в регуляцию экспрессии генов, подавление мобильных элементов генома [2]. Аномальное метилирование ДНК генов, специфичных для плаценты, может прямо или косвенно влиять на имплантацию, рост и развитие эмбриона, приводя к невынашиванию беременности [3]. Кроме того, анеуплоидный кариотип в плацентарных тканях также ассоциирован с нарушениями профиля метилирования генома.

Цель данной работы – оценить влияние геномного контекста на нарушения метилирования ДНК в ворсинах хориона спонтанных абортусов первого триместра беременности с моносомией X-хромосомы.

Экспериментальная часть. Материалом для данного исследования служили клетки трофобласта хориона спонтанных абортусов первого триместра беременности с моносомией X-хромосомы. С помощью STR-анализа был проведен анализ родительского происхождения X-хромосомы у спонтанных абортусов с кариотипом 45,X. В результате были сформированы группы спонтанных абортусов с X-хромосомой материнского происхождения (matX, n = 4) и с X-хромосомой отцовского происхождения (patX, n = 4). В качестве группы контроля использовались медицинские абортусы мужского (n = 3, maXY) и женского (n = 4, maXX) пола. Уровень метилирования оценивался с помощью метода бисульфитного массового параллельного секвенирования ограниченного набора геномных локусов (reduced representation bisulfite sequencing – RRBS). Секвенирование осуществлялось на приборе NextSeq 550 (Illumina, США) с получением двусторонних прочтений (2x75), в качестве референса была использована сборка генома человека hg38. На полученных выравниваниях осуществлялся анализ индекса метилирования каждого отдельного CpG-сайта и выявление дифференциально-метилированных CpG-сайтов (ДМС), которые получилось определить в группах сравнений, каждая группа интереса пересекалась с каждой из групп контроля. В анализ принимались только CpG-сайты с покрытием более 10х.

Результаты. Всего было проанализировано более миллиона CpG-сайтов в каждом сравнении (Таблица 1), а также было рассчитано процентное содержание гипо- и гиперметилированных ДМС во всех исследуемых группах (Таблица 2). Спонтанные абортусы с моносомией X (кариотип 45,X) с X-хромосомой материнского происхождения (matX) и с X-хромосомой отцовского происхождения (patX) имели значительные отличия по профилю метилирования по сравнению с медицинскими абортусами с кариотипами 46,XX и 46,XY (Таблица 1).

Таблица 1

Количество детектированных гипо- и гиперметилированных сайтов в группах спонтанных абортусов по сравнению с медицинскими абортусами

Выборка / Образцы	Гиперметилированные сайты	Гипометилированные сайты
matX_maXX	44376	71796
matX_maXY	4591	5353
patX_maXX	44434	73433
patX_maXY	2985	3234

Таблица 2

Процентное содержание гипо- и гиперметилированных CpG-сайтов в группах спонтанных абортусов с моносомией X по хромосоме X и в остальном геноме

Сравнение групп образцов	Число гипоДМС на X-хромосоме (% от всех ДМС в геноме)	Число гипоДМС на остальных хромосомах (% от всех ДМС в геноме)	Число гиперДМС на X-хромосоме (% от всех ДМС в геноме)	Число гиперДМС на остальных хромосомах (% от всех ДМС в геноме)
matX_maXX	5,21 %	94,79 %	3,10 %	96,90 %
matX_maXY	2,20 %	97,80 %	2,90 %	97,10 %
patX_maXX	4,92 %	95,08 %	2,88 %	97,12 %
patX_maXY	2,54 %	97,46 %	2,55 %	97,45 %

Анализ полученных ДМС (Таблица 1) для каждого из сравнений показал меньшую вариабельность уровней метилирования в группах *patX* и *matX* по сравнению с группами медицинских абортусов (*maXX*, *maXY*). Для полученных ДМС были определены регионы с большей плотностью ДМС на участок генома (1 Mb), которые преимущественно находились в прителомерных регионах (в пределах 10 Mb от теломер). Интересно, что в данных регионах была повышена плотность и гипо-, и гиперметилированных CpG-сайтов. Анализ обогащения на данных участках показал наличие обогащения в 1,7 раза по сравнению со значениями в среднем по всему геному для каждой из групп сравнений, для гипер- и для гипометилированных ДМС. Повышенная плотность ДМС в прителомерных регионах наблюдалось не на всех хромосомах и коэффициент корреляции не превышал 0,3 на большинстве хромосом. Данный результат может быть связан не с влиянием данного региона на повышенный мутагенез, а с большим содержанием GC, что и влияет на плотность ДМС. Действительно, присутствовала значимая положительная корреляция между количеством ДМС на участок хромосомы (1 Mb) и содержанием GC, для гипер- и гипометилированных ДМС групп *matX_maXX*, *patX_maXX*. Так как была обнаружена связь между количеством ДМС и повышенным содержанием GC на участке генома, была выдвинута гипотеза о возможном повышенном содержании ДМС в функционально значимых элементах генома. В данном исследовании в качестве функционально значимых элементов генома были взяты ламина-ассоциированные домены (LAD), и ретротранспозоны семейств: LINE, SINE, LTR. Анализ обогащения выявленных ДМС в регионах доменов, ассоциированных с ламинной (LAD), ретротранспозонов и других повторяющихся последовательностей, проведенный для более детального понимания распределения гипо- и гиперметилированных ДМС внутри регионов интереса, показал, что в данных регионах наблюдается обогащение ДМС в среднем в 2 раза по сравнению со значениями в среднем по всему геному для каждой из групп сравнений, для гипер- для гипометилированных ДМС. Это можно интерпретировать как повышенную вероятность эпигенетической нестабильности и повышенной вариабельности генома при патологиях в участках LAD, в которые довольно часто входят множество семейств ретротранспозонов.

Заключение. Из полученных данных можно сделать выводы о том, что у спонтанных абортусов с моносомией X наблюдается сходное распределение уровня метилирования в геноме, значительно отличающееся от нормального. Плотность распределения аномалий метилирования в геноме зависит от локального геномного контекста, возрастая в регионах с повышенным содержанием CG. Анализ обогащения показал увеличенное обогащение гипо- и гиперметилированных ДМС на участках LAD и ретротранспозонов, хотя эти регионы в норме должны эпигенетически подавляться. Изменение уровня метилирования в данных регионах может вести к нарушению протекания беременности и, как следствие, к спонтанному аборту.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zeng Y., Chen T. DNA methylation reprogramming during mammalian development // *Genes*. – 2019. – V. 10., №. 4. – P. 257.
2. Goll M. G., Bestor T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases // *Annu. Rev. Biochem.* – 2005. – V. 74. – P. 481-514.
3. Song X. et al. Differential methylation of genes in the human placenta associated with bisphenol A exposure // *Environmental Research*. – 2021. – V. 200. – P. 111389.

УДК 611.16:611.81.013:613.81

**THE INFLUENCE OF CHRONIC INTRAUTERINE ALCOHOL INTOXICATION
ON THE MORPHOMETRIC PARAMETERS OF THE MAIN COMPONENTS
OF THE CEREBRAL CORTEX OF HUMAN EMBRYOS**

S.N. Shumilova

Scientific Supervisor: Prof., Dr., A.V. Solonskii

Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Aleutskaya str., 4, 634014

E-mail: sofashumilova97@gmail.com

**ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ВНУТРИУТРОБНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ
НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ КОРЫ
ГОЛОВНОГО МОЗГА ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА**

С.Н. Шумилова

Научный руководитель: профессор, д.м.н. А.В. Солонский

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр,

Россия, г. Томск, ул. Алеутская, 4, 634014

E-mail: sofashumilova97@gmail.com

***Аннотация.** Данное исследование направлено на изучение коры головного мозга эмбрионов человека, развивавшихся в условиях хронической внутриутробной алкогольной интоксикации. В ходе работы был выявлен ряд морфометрических особенностей: установлено уменьшение размеров и увеличение количества сосудов микроциркуляторного русла, а также нейробластов с увеличением срока развития в условиях пренатальной алкоголизации. Кроме того, было выявлено нарушение нормального паттерна развития глиобластов в сочетании с аналогичным компенсаторным увеличением среднего количества клеток.*

Introduction. The histological structure of the human cerebral cortex has been studied rather extensively; as early as in the 19th century, Ramon y Cajal described its structure in his works and created a theoretical basis for the development of all neurobiology. Currently, active work is underway to study the normal prenatal development of the brain, as well as the influence of various damaging factors on this process. One of the most common teratogens is ethanol, which is part of alcoholic beverages. Alcohol consumption during pregnancy can lead to macroscopic defects in brain development, such as a decrease in brain volume, to the point of microcephaly, impaired gyrification, hydrocephalus, subarachnoid hemorrhages, heterotopias, holoprosencephaly, lissencephaly, and others [1-3]. In addition, the nervous tissue itself undergoes significant morphologically detectable changes. There are publications indicating a disruption of neuroblast migration, as well as an increase in apoptosis and a general decrease in the number of nerve cells [4, 5]. The effect of prenatal alcohol intoxication on different types of glioblasts is heterogeneous and is determined by the area of study and the protocol of the experiment. Nevertheless, the studies of most authors indicate a general trend towards a reduction in the cell pool of almost all populations of glial cells due to impaired migration and maturation of progenitor cells [6]. The reaction of the vessels of the microvasculature is also a subject of discussion. Some works demonstrate an increase in the density of blood vessels, their length, and the number of branch points [7].

Other studies, on the contrary, indicate a decrease in the density of MCB vessels and the loss of their radial orientation [8]. Summarizing the above, we can conclude that the issue of morphological changes in the nervous tissue during prenatal alcohol intoxication is widely covered. However, most of the studies have a narrow focus and do not consider the complex changes that occur in human brain tissue under the influence of prenatal alcohol intoxication. Thus, the purpose of this work is to assess the degree of influence of chronic intrauterine alcohol intoxication on the morphometric parameters of the structures and cells of the embryonic brain cortex (vessels of the microvasculature, neuroblasts, glioblasts) at different stages of intrauterine development.

Research methods. The object of the study was the sensorimotor cortex of embryonic brain obtained during abortion operations. All procedures were performed taking into account the requirements of the ethical committee and with the written consent of the participants. The material was obtained from women aged 25-41. Depending on the medical history of the mother (presence or absence of the diagnosis "Alcoholism, stage I-II"), as well as the period of intrauterine development, four groups were formed. The first two groups included material obtained from somatically and mentally healthy women: Control1 (C1) – 8-9 weeks of development; Control 2 (C2) – 10-11 weeks of development. The following two groups included women suffering from alcoholism (disease history 3-13 years): Alcohol1 (A1) – 8-9 weeks of development; Alcohol2 (A2) – 10-11 weeks of development. A total of 26 samples were obtained. Preparation of the material for the study included fixation in a 1.5 % solution of glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer with a pH of 7.3-7.4, followed by additional fixation in a 1 % solution of osmium oxide. Next, the samples were dehydrated in ascending alcohol concentrations and embedded in epoxy resins (Araldite, USA). Semi-thin sections (0.5–1 μm) obtained using an Ultracut-E ultratome (Reichert, Austria) were subjected to microscopy. Staining was carried out with toluidine blue according to the standard method. Light microscopy was carried out using an AxioScope A1 microscope (Carl Zeiss, Germany), and a Canon G10 digital camera was used for photography. Morphometric analysis was carried out using AxioVision 4.8 software (Carl Zeiss, Germany). We measured the diameter and area of the vessels of the microvasculature, neuroblasts, and glioblasts, and also calculated their average and specific (the ratio of the total number of elements to the area of the cut) number of cells or vessels per 1 mm^2 of the section. For vessels, their specific area was also calculated (the ratio of the sum of the areas of all the studied structures on the section to the area of the section itself) as a percentage. Statistical software with analysis of the Mann-Whitney test was used to determine statistical significance (significant differences at $p < 0.05$).

Results. During the study, it was found that the nervous tissue that developed under conditions of chronic prenatal alcohol intoxication undergoes a number of morphometric changes. When studying the vessels of the microvasculature, it was found that with an increase in the period of intrauterine development, there is a significant decrease in the average and specific areas of the vessels, as well as an increase in the average and specific number of the studied structures in groups A1 and A2 compared with control groups (C1 and C2). The brain tissue that developed in the context of maternal chronic alcoholism (A2) at later stages of development was characterized by a decrease in the size of blood vessels with an increase in their quantity on the section. In the course of studying the morphometric parameters of glioblasts, significant differences in cell sizes were observed at earlier stages of development (8-9 weeks), which was characterized by the predominance of glioblast sizes in the C1 group over those in the A1 group. At the same time, the corresponding parameters of samples at the age of 10-11 weeks did not have significant differences. Also in this case, an increase in the average number of

glioblasts in the alcohol groups (A1 and A2) was noted at all the studied periods. When studying the morphometric characteristics of neuroblasts, it was found that with an increase in the period of intrauterine development, there is a negative dynamic in the rate of differentiation of neuroblasts in the tissue that developed in the context of alcoholization. This manifested in increased sizes of nerve cells in the A2 group compared with the corresponding parameters of the C2 group. At the same time, the change in the parameters of the distribution density of cellular elements on the section had the following character: in the early stages of intrauterine development, there was a significant predominance (40 %) of the number of neuroblasts in the tissue exposed to ethanol (indicators A1 prevailed over C1). However, with an increase in the period of development, the studied indicator changed towards the tissue that developed under normal conditions (6 %) (the C2 values exceeded the values in the A2 group).

Conclusion. Thus, during the study, it was found that prenatal alcohol intoxication has a significant effect on the morphometric parameters of vessels of the microvasculature, neuroblasts and glioblasts of human embryos. This influence manifests in a change in the size and number of cellular and vascular structures and a disproportionate development of the entire brain tissue, progressing with an increase in the period of intrauterine development.

REFERENCES

1. Jarmasz JS, Basalah DA, Chudley AE, Del Bigio MR. (2017). Human brain abnormalities associated with prenatal alcohol exposure and fetal alcohol spectrum disorder [Electronic version]. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, no. 76, pp. 813-33.
2. Moore EM, Xia Y. (2022). Neurodevelopmental Trajectories Following Prenatal Alcohol Exposure [Electronic version]. *Frontiers in Human Neuroscience*, no. 15, pp. 695855.
3. Kilpatrick LA, Joshi SH, O'Neill J, Kalender G, Dillon A, Best KM, Narr KL, Alger JR, Levitt JG, O'Connor MJ. (2021). Cortical gyrification in children with attention deficit-hyperactivity disorder and prenatal alcohol exposure [Electronic version]. *Drug and Alcohol Dependence*, no. 225, pp. 108817.
4. Delatour LC, Yeh PW, Yeh HH. (2019). Ethanol Exposure In Utero Disrupts Radial Migration and Pyramidal Cell Development in the Somatosensory Cortex [Electronic version]. *Cerebral Cortex*, no. 29, pp. 2125-39.
5. Farber NB, Creeley CE, Olney JW. (2010). Alcohol-induced neuroapoptosis in the fetal macaque brain [Electronic version]. *Neurobiology of Disease*, no. 40, pp. 200-6.
6. Wilhelm CJ, Guizzetti M. (2016). Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview from the Glia Perspective [Electronic version]. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, no. 9, pp. 65.
7. Siqueira M, Araujo APB, Gomes FCA, Stipursky J. (2021). Ethanol Gestational Exposure Impairs Vascular Development and Endothelial Potential to Control BBB-Associated Astrocyte Function in the Developing Cerebral Cortex [Electronic version]. *Molecular Neurobiology*, no. 58, pp. 1755-1768.
8. Jégou S, El Ghazi F, de Lendeu PK, Marret S, Laudenbach V, Uguen A, Marcorelles P, Roy V, Laquerrière A, Gonzalez BJ. (2012). Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain [Electronic version]. *Annals of Neurology*, no. 72, pp. 952-960.

УДК 614.888

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ И СРЕДСТВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ
ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИК ТОМОГРАФИИ ГЕМАТОМ**

Е.А. Юрченко

Научный руководитель: доцент, к.ф.-м.н., С.Н. Торгаев
Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050
E-mail: kattifi@mail.ru

**DEVELOPMENT OF METHODS AND TOOLS FOR INCREASING THE DIAGNOSTIC
CAPABILITIES OF IR HEMATOMOGRAPHY**

E.A. Yurchenko

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., PhD., S.N. Torgaev
Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050
E-mail: kattifi@mail.ru

***Abstract.** The article discusses the use of the near-IR spectroscopy method for the possibility of diagnosing intracranial hematomas (and their characteristics) and the issues of implementing the device. The device is planned to be used in experimental studies in order to develop express diagnostics of brain hematomas in out-of-hospital conditions. The existing devices for emergency diagnosis of hematomas are also considered and their shortcomings are revealed. A mock-up of a hardware and software complex is proposed for the study of the method of optical diagnosis of brain hematomas, which allows automated collection of experimental data. The article describes the work of the hardware and software complex and the type of experimental studies aimed at implementing methods for determining the presence of a hematoma and its characteristics.*

Введение. При получении черепно-мозговой гематомы необходимо оперативно определить вид гематомы и степень ее тяжести для назначения дальнейшего лечения. На данный момент достоверными методами выявления внутричерепных гематом являются компьютерная томография (КТ) и МРТ. Однако данные способы диагностики возможны только в условиях проведения исследований в стационаре. Также на рынке существует «Infrascanner 2000» [1], разработанный в компании InfraScan, который представляет собой портативное сканирующее устройство для первичного обнаружения внутричерепного кровоизлияния и выявления пациентов, нуждающихся в немедленной госпитализации и дальнейших хирургических вмешательствах. Данное устройство работает в ближнем ИК-диапазоне (805 нм). Согласно исследованиям [2, 3], Infrascanner 2000 имеет высокую чувствительность. Однако, данное устройство имеет ограничение при поиске гематомы (глубина залегания не более 2,5 см от коры мозга и размер не более 3,5 см³) и не позволяет определить параметры самой гематомы (размер, глубина залегания, локализация), которые очень важны для проведения реанимационно-реабилитационных мероприятий.

Принцип работы прибора Infrascanner 2000 построен на сравнительном методе, т.е. выявление гематом происходит путем сравнения оптических свойств симметричных участков на голове в точно заданных точках. Таким образом, остается высокая вероятность не заметить небольшие или глубоко

залегающие гематомы вне этих зон. Исходя из данных недостатков, очевидно, что необходимо дальнейшее совершенствование метода и устройства для получения не только качественных, но и численных данных о параметрах диагностируемой гематомы. Таким образом актуально создание прибора, позволяющего осуществлять диагностику в условиях отличного от стационара.

Экспериментальная часть. Ближняя ИК спектроскопия представляет собой современный метод количественного и качественного анализа различных объектов, основанный на сочетании спектроскопии и статистических методов исследования многофакторных зависимостей. В основе метода лежит характеристика в виде спектра поглощения молекул вещества, а интенсивность поглощения зависит от содержания поглощающего компонента в облучаемом объекте. В разрабатываемом устройстве и в экспериментах диагностика и определение местоположения гематом основаны на том, что гемоглобин является хромофором - веществом, которое поглощает свет на конкретной частоте. Если в данном месте есть гематома, то из-за скопления крови концентрация оксигемоглобина (HbO₂) и дезоксигемоглобина (Hb) в данном месте будет выше, и при пропускании света в диапазоне 700-900 нм в направлении гематомы, большая часть света будет поглощена, и малая часть отразится, это и будет означать наличие гематомы в данном месте [4].

Принцип диагностики внутричерепных гематом с использованием инфракрасного сканера основан на обработке изображения молекулы гемоглобина, полученного с помощью облучения волнами ИК-спектра ближнего диапазона. Датчик оснащен источником ИК и кремниевым приемником сигнала, который имеет фильтр полосы пропускания для минимизации помех, вызываемых отраженным сигналом. Датчик, через источник ИК, посылает инфракрасное излучение, которое попадает на область ткани через оптоволокно. Детектор принимает отраженный сигнал. Далее, сигнал поступает на ПК (минуя АЦП), который преобразует полученные данные для наглядного представления результата. В результате экспериментов будут получены наборы данных для анализа влияния характеристик гематом на регистрируемые сигналы.

На основании полученных данных можно будет разработать методы анализа и обработки, в том числе с привлечением алгоритмов машинного обучения, позволяющие эффективно определять пространственную локализацию и геометрические параметры гематом.

Результаты. Макет для проведения исследований (см. Рисунок 1) состоит из системы 3D позиционирования (для возможности перемещения аналога гематомы в пространстве), фантом головы (включает в себя аналоги тканей человека), аналог гематомы (закрепляется на проволоке), источник и приемник излучения (расположенных над модельной средой имитирующей структуры головы), микроконтроллер для управления составляющими, и ПК для сбора и анализа данных.

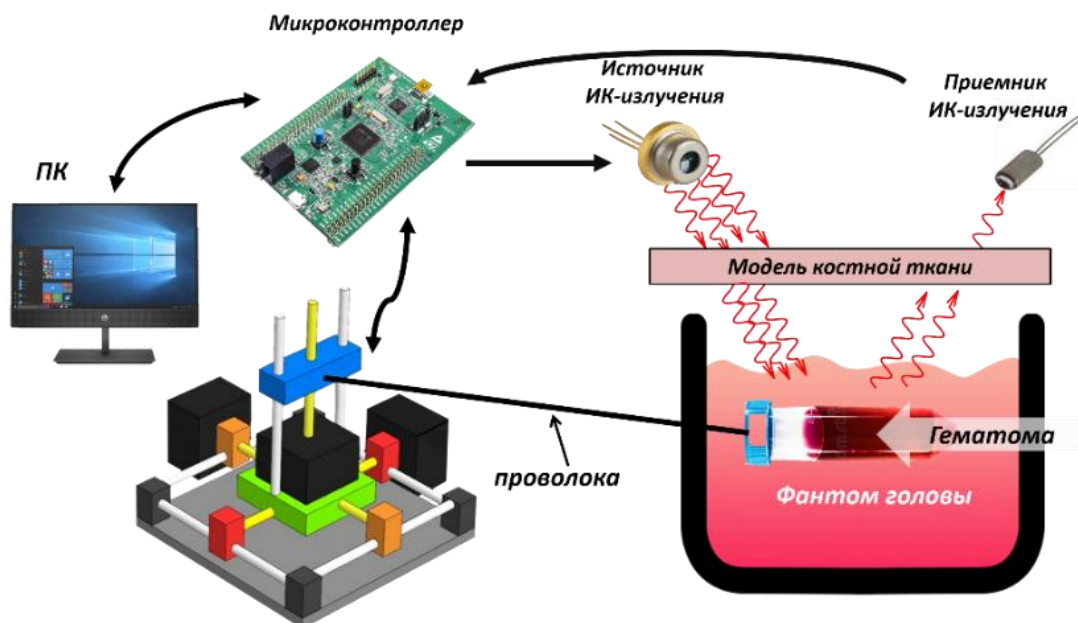


Рис. 1. Макет программно-аппаратного комплекса

Закключение. В данной статье представлен макет программно-аппаратного комплекса для исследования метода оптической диагностики гематом мозга с описанием составляющих. Описана работа макета и предполагаемые методы обработки сигналов с фотодетектора. В дальнейшем планируется реализация данного макета, подборка аналогов для тканей человека и проведение экспериментальных исследований с целью сбора данных. Также планируется разработать собственное программное обеспечение для визуализации результатов экспериментов и их машинного анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Near Infrared Technology [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://infrascanner.com/models/> (дата обращения 23. 02. 2023).
2. Bressan S., Daverio M., Martinoli F., Dona D., Mario F., Steiner I.P., Da Dalt L. The use of handheld near-infrared device (Infrascanner) for detecting intracranial hemorrhages in children with minor head injury // Childs NervSyst. – 2013. – №30. – P. 477-484.
3. Robertson C.S., Zager E.L., Narayan R.K., Handly N., Sharma A., Hanley D.F., Garza H., Maloney-Wilensky E., Plaum J.M., Koenig C.H., Johnson A., Morgan T. Clinical Evaluation of a Portable Near-Infrared Device for Detection of Traumatic Intracranial Hematomas // Journal of Neurotrauma. – 2010. – № 9. – P. 1597–1604.
4. Jose L-C., Jose M. D-R., Umberto L-D., Francisco M-C. The Infrascanner, a handheld device for screening in situ for the presence of brain haematomas [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02699052.2010.506636> (дата обращения 18.02.2023)

УДК 577.29

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ ИММУННОГО ИНФИЛЬТРАТА В ОПУХОЛИ ЯИЧНИКАП.С. Ямщиков^{1,2}, Е.О. Казакова^{1,2}, И.В. Ларионова^{1,2}

Научный руководитель: профессор, д.б.н., Ю.Г. Кжышковска

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

²НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр,

Россия, г. Томск, Кооперативный переулок, 5, 634050

E-mail: mrriamshchikovpavel@gmail.com**FUNCTIONAL ACTIVATION OF IMMUNE INFILTRATE IN OVARIAN TUMORS**P.S. Iamshchikov^{1,2}, E.O. Kazakova^{1,2}, I.V. Larionova^{1,2}

Scientific Supervisor: Prof., Dr., J. Kzhyskowska

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050²Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634050E-mail: mrriamshchikovpavel@gmail.com

Abstract. Ovarian cancer is one of the most common gynecological cancers that associated with the large number of unresolved issues related to late diagnosis, difficulties in deciding on treatment tactic, a high rate of relapses, and ultimately low treatment efficacy rates and high mortality rates. In the current study we applied Nanostring GeoMx spatial transcriptomic approach to characterize CD45⁺ immune infiltration of ovarian cancer patients. We compared two distinct compartments of CD45⁺ infiltration, namely, inside and outside of tumor. The difference in functional activation of two immune compartments was characterized using results of differential expression analysis and construction of correlational gene network.

Введение. Актуальность изучения рака яичников обусловлена высокими показателями заболеваемости и смертности. На сегодняшний день рак яичников является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований женской репродуктивной системы. В большинстве случаев рак яичника развивается бессимптомно, поэтому часто диагностируется на поздней стадии в связи с чем отличается сложностью в выборе тактики лечения, высокой долей рецидивов, и, в конечном итоге, низкими показателями эффективности лечения и высокими показателями летальности [1]. На данный момент, убедительно показано, что опухолевое микроокружение является одним из основных факторов, определяющих характер и скорость роста опухоли, а также ее метастазирование и рецидив, что определяет клиническую и прогностическую значимость микроокружения [2, 3]. Пространственное транскриптомное секвенирование позволяет оценивать экспрессию генов в клетках непосредственно на срезах тканей в контексте паренхиматозно-стромальных взаимоотношений и проводить корреляции с патоморфологическими характеристиками [4]. В данной работе провели пространственное транскриптомное секвенирование опухолей яичника с помощью технологии Nanostring GeoMx и провели сравнение внутри и внеопухолевых компартментов CD45⁺ иммунного инфильтрата.

Экспериментальная часть. В данной работе провели пространственное транскриптомное профилирование с помощью платформы Nanostring GeoMx 4 образцов FFPE пациентов с раком яичника. Материал был собран на базе клиники НИИ онкологии Томского НИМЦ. Исследование было проведено в соответствии с местным комитетом по медицинской этике НИИ Онкологии ТНИМЦ. Срезы тканей были обработаны согласно инструкции к платформе Nanostring GeoMx. Полученные библиотеки секвенировали на платформе Illumina NextSeq 2000 с использованием 2 x 27 парных прочтений. Сырые прочтения были обработаны в NanoString GeoMx NGS 2.1, где они были преобразованы в файлы DCC. GeomxTools использовался для контроля качества и последующего анализа файлов DCC в R. Анализ дифференциальной экспрессии проводили с использованием пакета limma. Генные регуляторные сети были получены с помощью пакета WGCNA, значимость различий получали в пакете limma. Функциональная аннотация проведена с использованием базы данных Hallmark, KEGG, REACTOME и Gene Ontology в онлайн базах данных Enrichr и STRING.

Результаты. С помощью биоинформатической обработки получили данные о дифференциальной экспрессии генов между внутри и внеопухолевых компартментов CD45⁺ иммунного инфильтрата на срезах рака яичника. Во внутриопухолевых компартментах наблюдается активация генов, обладающих провоспалительной активностью, связанных с комплементом, ERBB2 сигналингом и апоптозом. Во внеопухолевых компартментах преобладают гены, участвующие в эпителиально-мезенхимальном переходе, связанные с коагуляцией, активностью матриксных металлопротеиназ и макрофагами (рис.1).

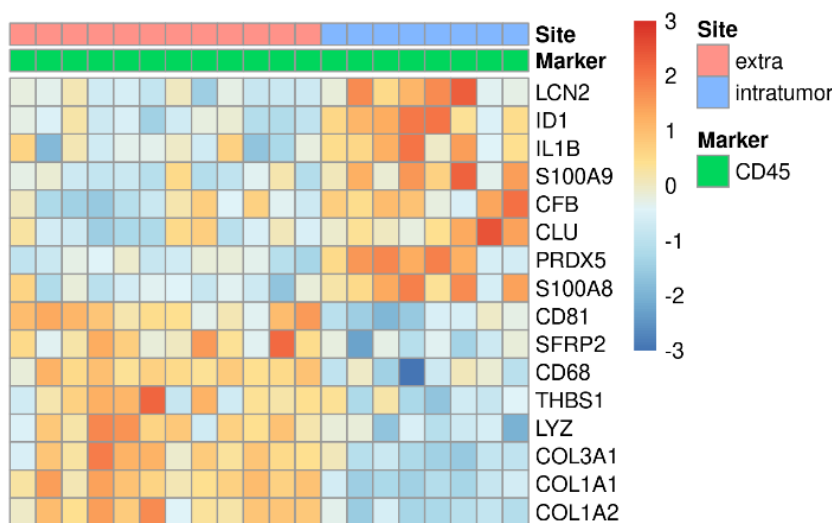


Рис. 1. Топ 16 дифференциально экспрессирующихся генов с $FDR < 0.05$, где *intratumor* – внутриопухолевый компартмент, *extra* – внеопухолевый компартмент

Для более подробной характеристики различий между двумя компартментами иммунного инфильтрата построили генные регуляторные сети, используя корреляционный анализ. Получили две значимо различающиеся генные сети с $FDR < 0.05$. Генная сеть, активированная в иммунных клетках внутриопухолевого компартмента связана преимущественно с активностью Т-лимфоцитов, MAPK сигнального пути и поддержанием пролиферации, в то же время, негативно связана с апоптозом. Генная сеть внеопухолевого компартмента связана с организацией внеклеточного матрикса, антиген-презентацией, позитивной регуляцией клеточной дифференцировки, васкуляризацией и активностью врожденного иммунитета и макрофагов (рис 2.).

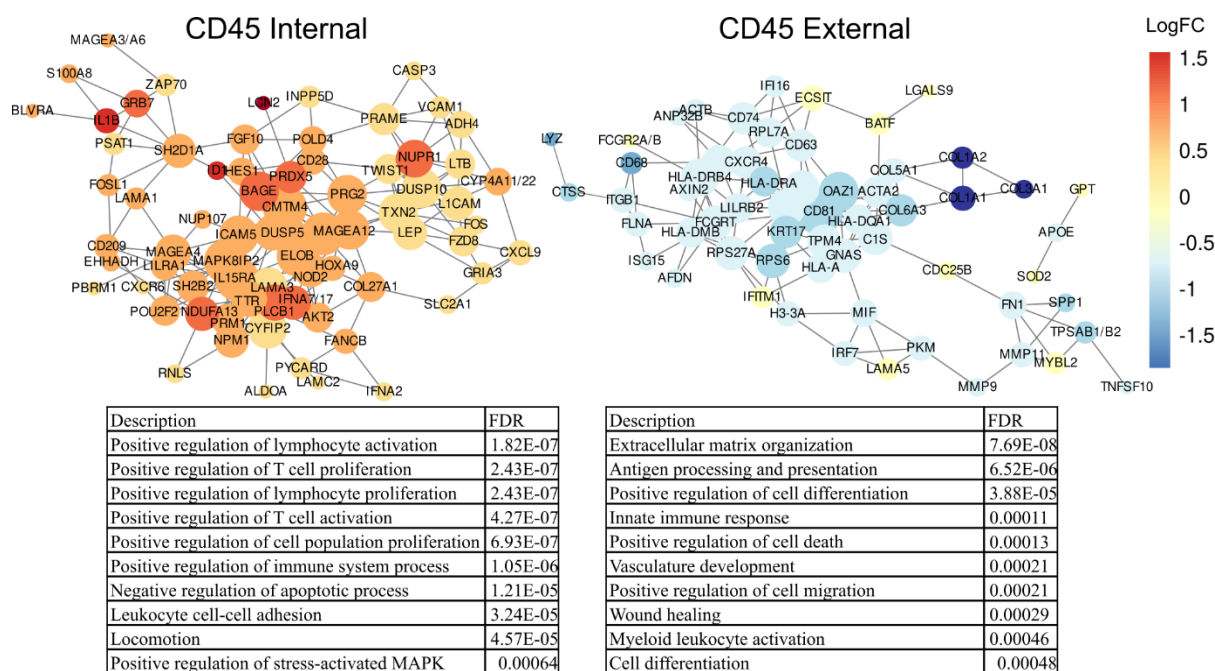


Рис.2. Топ сигнальных и биохимических путей двух различающихся ($FDR < 0.05$) генных регуляторных сетей для двух компартментов. где *Internal* – внутриопухольный компартмент, *External* – внеопухольный компартмент

С помощью полученной функциональной аннотации выяснили различия в вовлеченности иммунной системы в развитие опухоли в зависимости от локализации иммунного инфильтрата.

Заключение. Полученные различия показывают, что во внутриопухольных компартментах иммунный ответ преимущественно представлен активацией воспаления и Т-лимфоцитов, в то время как внеопухольные компартменты представлены активацией врожденного иммунитета, макрофагами, перестройкой внеклеточного матрикса и васкуляризацией.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №21-75-10021 и Российской Федерации в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1073 на тему: «Генетическое и эпигенетическое редактирование клеток опухоли и микроокружения с целью блокировки метастазирования»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Narod S. Can advanced-stage ovarian cancer be cured? // Nature Reviews Clinical Oncology. – 2016. – V. 13(4). – P. 255-261.
2. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy // Nature Medicine. – 2018. – V. 24(5). – P. 541-550.
3. Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, et al. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers // Frontiers in Oncology. – 2020. – V. 10. – P. 566511.
4. Marx V. Method of the Year: spatially resolved transcriptomics // Nature Methods. – 2021. – V. 18(1). – P. 9-14.

Научное издание

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

Сборник научных трудов
XX Международной конференции студентов, аспирантов
и молодых ученых

Компьютерная верстка *С.А. Поробова*

**Зарегистрировано в Издательстве ТПУ
Размещено на корпоративном портале ТПУ
в полном соответствии с качеством предоставленного оригинал-макета**



ИЗДАТЕЛЬСТВО
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ