

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

Сборник научных трудов
XXII Международной конференции студентов, аспирантов
и молодых ученых
22–25 апреля 2025 г.

PROSPECTS OF FUNDAMENTAL SCIENCES DEVELOPMENT

Volume 4. Biology and fundamental medicine

Abstracts
XXII International Conference of students, graduate students
and young scientists
April 22–25, 2025



Томск 2025

УДК 501:004(063)

ББК 72:32.81л0

П27

П27 **Перспективы развития фундаментальных наук** : сборник трудов XXII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Томск, 22–25 апреля 2025 г.) : в 7 томах. Том 4. Биология и фундаментальная медицина / под ред. И.А. Курзиной, Г.А. Вороновой. – Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2025. – 142 с.

ISBN 978-5-4387-1259-6 (т. 4)

ISBN 978-5-4387-1255-8

Сборник содержит труды участников XXII 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 978-5-4387-1259-6 (т. 4)

ISBN 978-5-4387-1255-8

© ФГАОУ ВО НИ ТПУ, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

Cases of double chromosomal aneuploidy in chorionic villi of spontaneous abortions <i>M.V. Kankanam Patiranaige, A.S. Zuev, D.G. Shevtsov</i>	6
Эффекты дексаметазона на олигодендроциты и содержание миелина в нормальной ткани головного мозга мышей <i>С.Д. Аладьев, Д.К. Соколов, М.О. Политко</i>	9
Влияние полисахаридсодержащего комплекса из семян лопуха войлочного (<i>Arctium tomentosum</i> Mill.) на развитие карциномы легких Льюис у мышей линии C57Bl/6 и эффективность цитостатической терапии <i>Л.А. Ан, О.Ю. Рыбалкина, А.К.Х. Али</i>	12
Сравнительный анализ роли лимфоцитов в поляризации макрофагов кишечника мышей Muc2-/- на разных этапах онтогенеза <i>В.Д. Бец, К.М. Ачасова, Е.П. Гончарова</i>	15
Особенности адаптационного потенциала студенток из Китайской Народной Республики <i>К.В. Бодягина, Э.Э. Нистор, И.П. Сюзева</i>	18
Сесквитерпеновые лактоны как модуляторы агрегации белка TDP-43 <i>М.В. Бурак</i>	21
Альтернативный сплайсинг в патогенетике задержки роста плода <i>М.М. Гавриленко, А.А. Бабовская, Е.В. Ижойкина</i>	24
Stages of lysosomal entosis in cancer tissue lung and colorectal cancer <i>К.А. Гаптулбарова., I.A. Tsydenova E.A. Kravtsova</i>	27
Изучение представленности <i>Tritrichomonas foetus</i> в популяции крупного рогатого скота Новосибирской области <i>И.Б. Грибченко, В.Д. Бец, К.Е. Евстропова</i>	30
Изучение метастатической способности карциномы легкого Льюиса под действием низкомолекулярных ингибиторов генов стволовости <i>Д.С. Долгашева, И.А. Цыденова, А.К. Шагабудинова</i>	33
Молекулярные маркеры опухоли толстой кишки и метастаза в печени у пациента с полным ответом на предоперационное лечение <i>Д.А. Еремин, Т.А. Дронова, Д.Н. Костромицкий</i>	36
Влияние иммунотаргетной терапии на уровень цитокинов в сыворотке крови у пациенток с раком эндометрия <i>Н.А. Ермак, А.А. Мальцева, Е.И. Ливанос</i>	39
Детекция гликопротеина Е вируса Западного Нила с помощью биосенсора <i>А.Н. Ерёмина, Д.В. Шаньшин, А.А. Черемискина</i>	42
Анализ генетической вариабельности вариантов вируса гепатита В, циркулирующих на территории Сибирского региона <i>А.С. Железнова</i>	45
Влияние степени пористости полилактидных матриц на адгезию клеток <i>К.Е. Заболотная, А.А. Суханова</i>	48
Структура морфологических изменений хрусталика при осложненной катаракте на фоне хронического персистирующего воспаления периферических отделов сетчатки и плоской части цилиарного тела <i>Д.Е. Зинович, Е.В. Иванова, В.В. Иванова</i>	51
Гормональная регуляция устойчивости регенерантов картофеля к гипотермии <i>М. Кадырбаев, Е.В. Бойко</i>	54
Кардиопротекторный эффект алкалоида зонгорина при экспериментальной модели синдрома такотсубо <i>М. Килин, А.В. Мухомедзянов</i>	57
Численное моделирование напряженного состояния в системе «кость–имплантат» при креплении с помощью винтов <i>В.В. Ким</i>	60
Спектральные характеристики освещения и их влияние на когнитивные функции студентов <i>В.А. Колесникова</i>	63
Изменение генетического ландшафта опухоли молочной железы под действием различных схем неoadьювантной химиотерапии <i>Е.А. Кравцова, А.К. Шагабудинова, К.А. Гаптулбарова</i>	66

Пространственно-временные характеристики ЭЭГ в процессе решения вербальных задач в контроле и при действии одорантов <i>Ю.Л. Кундупьян</i>	69
Исследование предикторов тромбоза при гиперкоагуляционном синдроме <i>А.И. Курганникова, П.Е. Никифоров</i>	72
Изучение пористости никелида титана (NiTi) с использованием оптической когерентной томографии <i>Т.Б. Лепехина, Г.В. Малкин, В.В. Николаев</i>	75
Анализ плацентоспецифичной экспрессии с альтернативного промотора ретротранспозона LINE-1 <i>И.В. Лушиников, М. А. Жилкина</i>	78
Влияние 28-гомокастастерона на растения Brassicaparus в оптимальных и стрессовых условиях <i>Д.С. Мельник</i>	81
Разработка и создание биосенсорной системы для детекции IPTG на основе синтетической конструкции cI/Plam_RFP логического вентиля NOT в клетках E. coli <i>С.А. Мельникова</i>	84
Определение высвобождения наночастиц серебра из различных лекарственных форм для местного применения <i>А.М. Минько, Д.А. Михалев</i>	87
Анализ индуцированной агрегации белка TDP-43 в мозге мышей с помощью методов машинного обучения <i>М.Р. Наздрачева</i>	90
Возможность прямого прессования в технологии таблеток эналаприла при производстве воспроизведенного препарата <i>М.А. Нечай</i>	93
Половые различия миелинизации мозга мышей линии CD-1: количественное МРТ исследование <i>А.Ц. Ранзаева, М.М. Шадрина, Д.А. Тур</i>	96
Полив растений ячменя раствором мелатонина для повышения засухоустойчивости <i>М.Н. Сергеева, Е.Д. Данилова</i>	99
Влияние химиотерапии на транскрипционный профиль моноцитов больных раком яичников <i>С.А. Сяркина, П.С. Ямщиков, М.А. Ракина</i>	102
Влияние длительной инсулинотерапии на интенсивность липолиза в изолированных адипоцитах крыс с экспериментальным стрептозоцин-индуцированным сахарным диабетом 1 типа <i>А.А. Уфандеев, Е.Е. Буйко</i>	105
Изучение некоторых биологических свойств семейства кукурбит[п]урилов <i>Д.А. Федоришин</i>	108
Перспективные противопаркинсонические агенты PA-198-1 и PA-198-2 и их влияние на холинергическую систему у модельных животных <i>А.Ю. Филиппова, А.В. Подтуркина</i>	111
Прогностическая значимость копийности генов WNT-сигналинга при раке гортани <i>И.А. Цыденова, Д.С. Долгашева, К.А. Гантулбарова</i>	114
Оценка изменений параметров воспалительной реакции в периваскулярной жировой ткани во взаимосвязи с уровнем лептина в экспериментальной модели диет-индуцированного метаболического синдрома <i>Н.А. Чернышов, О.В. Воронкова, Ю.Г. Бирулина</i>	117
Эффекты комбинированного цитотоксического воздействия на клеточные культуры наночастиц и бинарных наночастиц оксидов марганца и кобальта <i>Вэньцзин Чжэн</i>	120
Оценка изменений частоты CNA генов эксцизионной репарации в опухоли молочной железы <i>А.К. Шагабудинова, Е.А. Кравцова, Д.С. Долгашева</i>	123
The Effect of CNTN6 Deletion on Brain Myelination in Mice <i>М.М. Shadrina, Ya.A. Tumentseva, D.A. Tur</i>	126
Алгоритм идентификации пенистых макрофагов в микроокружении опухоли <i>К.Д. Шальгина, Е.О. Шмакова, Т.С. Сударских</i>	129

Химиоиндуцированная активность генов гомологичной рекомбинации в опухолевых клетках молочной железы <i>Ж. Шарипханова, А.А. Баянбаева, А.А. Фролова</i>	132
Биоинформатический анализ паттернов метилирования в геноме образцов ворсин хориона при различных патологиях беременности <i>Д.Г. Шевцов, А.Ю.Зуев, О.Ю. Васильева</i>	135
Влияние регулярных холодовых экспозиций на возрастную динамику экспрессии разобщающего белка UCP1 в жировых депо мышей <i>А.В. Якуненок, В. А. Кудинова</i>	138

УДК 575.224.232

Cases of double chromosomal aneuploidy in chorionic villi of spontaneous abortionsM.B. Kankanam Patirana¹, A.S. Zuev², D.G. Shevtsov^{1,2}Scientific Supervisor: PhD., S.A. Vasilyev^{1,2}¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina str., 36, 634050²Tomsk National Medical Center, RI of Medical Genetics, Russia, Tomsk, Moskovsky tr., 3, 634050E-mail: manithpathirana@gmail.com

Abstract. Spontaneous abortion is frequently linked to chromosomal abnormalities in the embryo, with aneuploidies representing a substantial proportion of these cases. Aneuploidies, which account for two-thirds of abortions, are predominantly characterized by copy number abnormalities in a single chromosome pair. The presence of combined chromosome copy number abnormalities in the karyotype is a rare and enigmatic occurrence. This study presents cases of double aneuploidy not previously reported in such chromosomal combinations. The first case revealed a combination of aneuploidies in chromosomes 7 and 8, while the second case exhibited aneuploidies in chromosomes 13 and 16. The identification of these rare double aneuploidy combinations is pivotal in enhancing our understanding of the underlying causes of spontaneous abortion and predisposition to chromosome non-disjunction. It underscores the necessity for further research to explore such rare instances, thereby contributing to the advancement of our knowledge in this field.

Key words: double aneuploidy, spontaneous abortion, karyotype, cytogenetics

Introduction

Spontaneous abortion (SA) has been defined as a pathological condition that occurs in 20 % of all clinically identified pregnancies [1]. Up to 2/3 of spontaneous abortions (SA) maybe caused by abnormalities in the chromosome set of the embryo - aneuploidies and polyploidies [2]. Among SA, aneuploidies on chromosomes 16, 22, 21 and 15 are the most frequently detected, with the presence of multiple aneuploidies at once accounting for about 4.6 % [3, 4]. Multiple aneuploidy refers to cases where numerical abnormalities are observed in more than one chromosome which were occurred by errors in two meiotic cycles, and they are of important medical and biological significance due to the rarity of their occurrence [5]. The most common combinations of aneuploidies consist mainly of chromosome groups G and E, most commonly including anomalies such as X/+21, +21/+22, +16/+21 and +7/+16 [5]. In this study, we applied the ultra-low coverage whole-genome sequencing (ulcWGS) method to karyotype spontaneous abortus specimens, and we were able to find that two cases exhibited double aneuploidies. The karyotype abnormalities observed in these samples were characterised by the presence of group C chromosomes (7 and 8) in the first case and group D (13) and E (16) chromosomes in the second case.

Research methods

Tissues of spontaneous abortions with an unknown karyotype were obtained from the biological collection of the "Biobank of the Population of Northern Eurasia" of the Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center. The gestational age, as determined by the date of the last menstruation, was found to be 8.4 and 9.5 weeks in samples 1 and 2, respectively. The maternal age was determined to be 28 and 36 years in samples 1 and 2, respectively. All participants signed an informed consent.

Extraembryonic mesoderm samples were separated under an inverted microscope Axiovert 200 (Carl Zeiss, Germany). Genomic DNA was isolated by the standard phenol-chloroform extraction method. The quality and quantity of DNA were analyzed on Nanodrop (Thermo, USA) spectrophotometer and Qubit 2.0 (Thermo, USA) fluorimeter.

The samples were subjected to karyotyping using ulcWGS. Subsequent sequencing was performed on a Genolab M (GeneMind, China) utilizing the manufacturer's chemistry and adhering

to the manufacturer's recommendations. Subsequent data processing was conducted using the software packages BWA 0.7.17, SAMtools v1.6, QDNaseq 1.40.0, and deepTools.

For verification of aneuploidies, DNA probes for the centromeres of chromosomes 7 and 8 were used. The analysis was performed using an Axio Imager Z2 microscope (Carl Zeiss, Germany) with Metafer and ISIS software (MetaSystems, Germany).

Verification of aneuploidy in sample which only DNA was available for analysis was performed by real-time PCR. Oligonucleotide primers were selected using the NCBI Gene, UCSC Genome Browser, Ensembl databases, and the Primer-BLAST, Oligoanalyzer programs for region of chromosome arms of 13 and 16 chromosomes (Table 1). The analysis was performed on an AriaMx device (Agilent Technologies, USA).

Table 1

Primers used for real-time PCR

Primer	Sequence, 5'-3'	Chromosome region
FAM155Aex3 F	AGTGTGACTGAGAGATGAAGGA	13q33.3
FAM155Aex3 R	GTCGCAGGGTTAAGTATGATGC	13q33.3
DIAPH3ex21 F	GAGCAATGTGAAGAGACTACGG	13q21.2
DIAPH3ex21 R	TTATCTCTTCGCAGGCAGTACT	13q21.2
PDPReX18 F	TGTTGGCCAGAAATACGGAATC	16q22.1
PDPReX18 R	TCTCTAATTTACCCGAGACTCT	16q22.1
PDZD9ex5 F	CTGGATAATGGTGAAGCAAGACA	16p12.2
PDZD9ex5 R	GGCTTTACCCTCTTCAACTGG	16p12.2

Results

The ulcWGS data revealed double aneuploidy in two samples of spontaneous abortions, corresponding to chromosomes 7 and 8 in the first case and chromosomes 13 and 16 in the second case (Fig. 1). FISH results determined a karyotype of 48,XY,+7,+8[166]/47,XY,+8[19]/47,XY,+7[12] in the first case (Fig. 1).

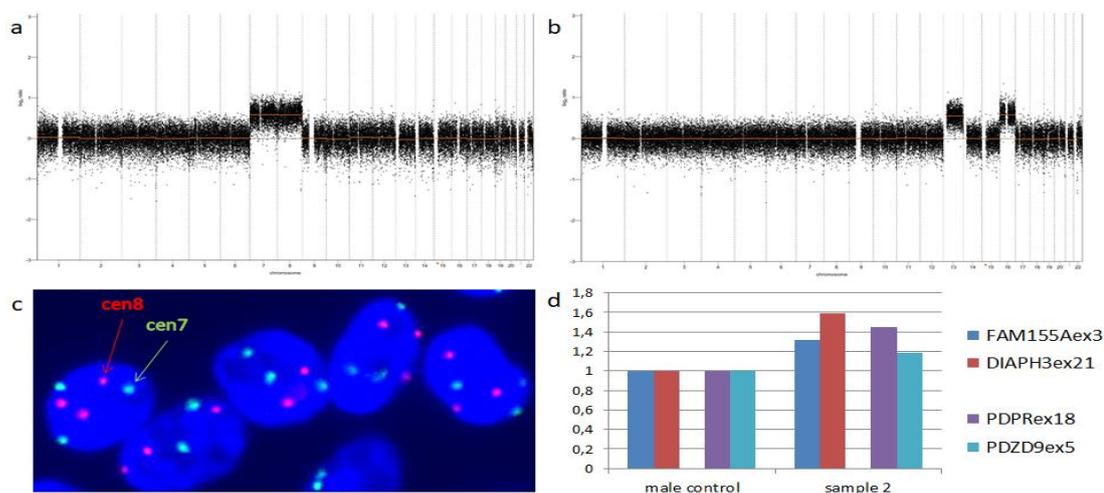


Fig. 1. Results of ulcWGS and verification by FISH and real-time PCR: a) Full genomic profile of the sample with identified trisomy 7 and 8 (sample 1); b) Full genomic profile of the sample with identified trisomy 13 and 16 (sample 2); c) Confirmation of trisomy by FISH using DNA probes on centromeric regions of chromosomes 7 and 8; d) Confirmation of trisomy 13 and 16 by real-time PCR

RT-PCR results showed the presence of additional material of chromosomes 13 and 16 in the second case, probably in mosaic form (Fig. 1).

Conclusion

Aneuploidy is defined as a chromosomal condition characterised by a deviation in chromosome number from a multiple of the haploid complement. The combination of multiple aneuploidies in a single organism is a rare event, with the main mechanism being non-disjunction in two meiotic cycles, which can come from either the same parent or different parental origins. In this study comparatively rare chromosomal combinations were identified. Chromosomal combination identified in the first case including the chromosomes 7 and 8 was a significantly rare combination that hadn't been mentioned in previous studies. In case two chromosome 13 and 16 was identified which is also not a common combination in double aneuploidy.

Most cases of double aneuploidy are random events, but their occurrence has been attributed to several factors, including maternal age. A review of the literature shows that most cases of double aneuploidy occur in mothers younger than 35 years old [6]. In our study, the ages of the mothers were 28 and 36 years, suggesting that some cases may be due to other factors, such as hereditary predisposition to non-disjunction [7], as well as other factors that need to be investigated.

The identification of aneuploidies is paramount for the establishment of a diagnosis and the formulation of future reproductive plans. This study has led to the identification of two novel combinations of double aneuploidies. Further research is necessary to identify and collate rare instances of double aneuploidy, with the aim of gaining a more profound understanding of the nature of spontaneous abortions and the predisposition factors for chromosome non-disjunction.

Reference

1. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins–Gynecology. ACOG Practice Bulletin No. 200: Early Pregnancy Loss // *Obstetrics & Gynecology*. – 2018. – Vol. 132, № 5. – P. e197–e207.
2. Essers R., Lebedev I.N., Kurg A., et al. Prevalence of chromosomal alterations in first-trimester spontaneous pregnancy loss // *Nature Medicine*. – 2023. – Vol. 29, № 12. – P. 3233–3242.
3. Subramaniyam S., Pulipal V.R., Mathew S. Double and multiple chromosomal aneuploidies in spontaneous abortions: A single institutional experience // *Journal of Human Reproductive Sciences*. – 2014. – Vol. 7, № 4. – P. 262–268.
4. Nair J., Shetty S., Kasi C.I., Thondehalmath N., Ganesh D., Bhat V.R., Mannadia S., Ranganath A., Nayak R., Gunasheela D., Shetty S. Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) – a single-center experience // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2022. – Vol. 39. – P. 729–738.
5. Murry J.B., Zou Y.S. Live-born double aneuploidy at the Johns Hopkins Cytogenomics Laboratory: Case report and review of the literature // *OBM Genetics*. – 2022. – Vol. 6, № 4. – P. 1–23.
6. Bozdogan S.T., Bisgin A. A rare double aneuploidy case (Down-Klinefelter) // *Case Reports in Pediatric Genetics*. – 2017. – Vol. 6, № 4. – P. 241–243.
7. Soylemez F. Double Aneuploidy in Down Syndrome // In: Dey S. (ed.). *Health Problems in Down Syndrome*. – 2015. – Chapter 6.

УДК 501:004(063)

**Эффекты дексаметазона на олигодендроциты и содержание миелина
в нормальной ткани головного мозга мышей**

С.Д. Аладьев, Д.К. Соколов, М.О. Политко

Научный руководитель: д.б.н. Э.В. Григорьева

Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики Федерального
исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины,

Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12, 630117

E-mail: s.aladev@alumni.nsu.ru

Dexamethasone effects to oligodendrocytes and myelin content in normal brain tissue of mice

S.D. Aladev, D.K. Sokolov, M.O. Politko

Scientific Supervisor: Dr. E.V. Grigorieva

Institute of Molecular Biology and Biophysics Federal Research Center of Fundamental and
Translational Medicine, Russia, Novosibirsk, Timakova str., 2/12, 630117

E-mail: s.aladev@alumni.nsu.ru

Abstract. *Glucocorticoids are used as anti-inflammatory drug in clinic for treatment various diseases, but they have many side effects. The aim of our study was to investigate dexamethasone (Dex) effects on oligodendrocytes and myelin content in normal brain tissue of mice. C57Bl/6 mice (n=60) received single and multiple Dex injections (2,5 mg/kg dose) intraperitoneally and all the studied parameters were analysed at 1-90 days after Dex administration. Oligodendrocytes were estimated by immunohistochemistry with specific antibodies Olig2. Myelin content was studied by staining with LuxolFastBlue (LFB) according to Viktorov. Dex administration did not affect on oligodendrocytes, but decreased myelin content (1,2-1,4-fold, $p<0.001$) at 3-15 days in normal brain tissue of mice. Suchwise, long-term Dex administration modifies cell composition of normal brain tissue by reducing the production of myelin content by oligodendrocytes, which can contribute to the development of neurodegenerative diseases.*

Key words: *glucocorticoid; dexamethasone; oligodendrocyte; myelin; normal brain; C57Bl/6.*

Введение

Дексаметазон (Dex) применяется в клинике для лечения различных заболеваний, таких как рассеянный склероз, COVID-19 и др [1–3]. Несмотря на множество положительных свойств, в частности, отличное противоопухолевое, противовоспалительное и противоаллергенное действия, Dex обладает также рядом побочных явлений. К побочным эффектам применения Dex часто относят синдром Кушинга, сахарный диабет и остеопороз [4, 5].

Существуют немногочисленные исследования, посвященные влиянию Dex на состав и структуру внеклеточного матрикса нормальной ткани головного мозга, однако еще более редко изучают влияние Dex на клеточный состав, в частности, олигодендроциты, и содержание миелина в нормальной ткани головного мозга.

Миелиновая оболочка покрывает отростки многих нейронов и способствует быстрому проведению нервного импульса. Вследствие демиелинизирующих заболеваний происходит разрушение миелиновых оболочек и нарушение в электропроводимости. Уровень содержания миелина может служить маркером любых патологических изменений, происходящих в ткани мозга.

Миелинизация в центральной нервной системе обеспечивается олигодендроцитами, поскольку эти глиальные клетки вырабатывают миелин для миелиновой оболочки. Маркером для определения олигодендроцитов является Olig2.

Целью нашего исследования было изучить долгосрочное влияние Dex на олигодендроциты и содержание миелина в нормальной ткани головного мозга мышей.

Экспериментальная часть

Мышам линии C57Bl/6 (60 самцов, возраст 7–8 недель) однократно и многократно внутрибрюшинно вводили Dex в дозировке 2,5 мг/кг.

Схема однократного введения Dex в дозировке 2,5 мг/кг: 1 инъекция каждые сутки.

Схема многократного введения Dex в дозировке 2,5 мг/кг: 5 суток однократное введение, перерыв 2 суток, затем 5 суток однократное введение.

Животных после однократного введения выводили из эксперимента на 1, 3, 7, 10 сутки, после многократного – на 15, 30, 60, 90 сутки.

Уровень содержания олигодендроцитов определяли методом иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания гистологических срезов нормальной ткани головного мозга.

Уровень содержания миелина оценивали методом окраски LFB с модификацией по Викторову (использование при дифференцировке водного раствора тетрабората натрия вместо водного раствора карбоната лития) [6]. Окрашивание проводилось в несколько этапов: депарафинизация, окрашивание, дегидратация, заключение под покрывную среду.

Результаты

Однократное и многократное введение Dex не влияло на содержание олигодендроцитов в нормальной ткани головного мозга мышей (рис. 1, А, С).

Однократное введение Dex в дозировке 2,5 мг/кг снижало уровень содержания миелина в 1,2 раза ($p = 0.03$) на 3–7 сутки после инъекции препарата (рис. 1, В, D).

Многократное введение Dex в дозировке 2,5 мг/кг также снижало уровень содержания миелина в 1,4 раза ($p < 0,001$) на 15 суток после инъекции (рис. 1, В, D).

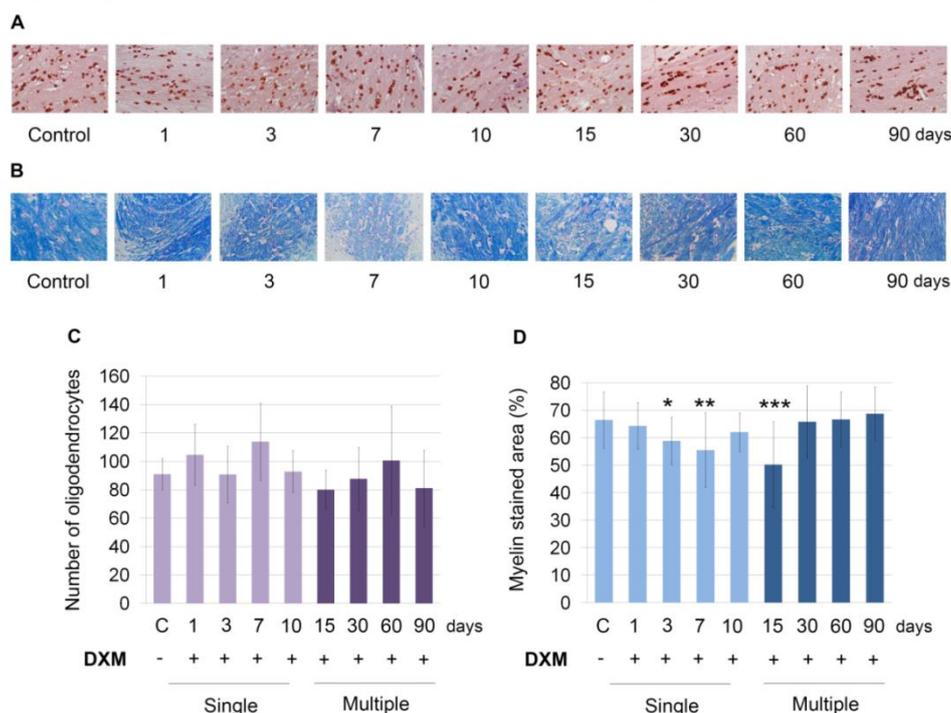


Рис. 1. Влияние дексаметазона на количество олигодендроцитов и содержание миелина в нормальной ткани мозга мыши. Микрофотографии окрашивания ИГХ на олигодендроциты антителами Olig2 (А).

Микрофотографии окрашивания миелина LuxolFastBlue (В). Количественный анализ количества олигодендроцитов в мозге мыши (С). Количество клеток определялось по количеству их ядер в окрашенной области образца. Количественный анализ содержания миелина в мозге мыши (D). Содержание определялось по проценту окрашенной области в образце. Dex (2,5 мг/кг) вводили в виде однократной инъекции с последующим наблюдением через 1, 3, 7 или 10 суток после введения или многократных инъекций с последующим наблюдением через 15, 30, 60 или 90 суток после последней введения. Контроль – мыши, получавшие физиологический раствор. Статистический анализ – ANOVA + тест Фишера;

*- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$.

Несмотря на отсутствие изменений олигодендроцитов под влиянием Дех, эти глиальные клетки, по-видимому, снижают выработку миелина в нормальной ткани головного мозга после инъекции препарата.

Заключение

В результате проведенных исследований было показано, что даже однократное введение Дех в дозировке 2,5 мг/кг способно снижать выработку миелина олигодендроцитами.

Этот факт указывает на способность долгосрочного введения Дех вызывать возможные нейродегенеративные изменения в нормальной ткани головного мозга мышей. Подобные изменения в клеточном составе нормальной ткани головного мозга могут стать предпосылкой для повышения риска развития демиелинизирующих заболеваний в будущем.

Исследование выполнено за счет бюджетного финансирования ФИЦ ФТМ по проекту «Постгеномные высокотехнологические исследования механизмов развития социально значимых заболеваний и стресс-индуцированных состояний».

Список литературы

1. Meybodi S., Rabori V., Salkhorde D., et al. Dexamethasone in COVID-19 treatment: Analyzing monotherapy and combination therapy approaches // *Cytokine*. – 2024. – Vol. 184. – P. 156794.
2. Hui Z., Zhijun Y., Yushan Y., et al. The combination of acyclovir and dexamethasone protects against Alzheimer's disease-related cognitive impairments in mice // *Psychopharmacology (Berl.)*. – 2020. – Vol. 237, № 6. – P. 1851–1860.
3. Lu J., Zhang C., Lv J., et al. Antiallergic drug desloratadine as a selective antagonist of 5HT_{2A} receptor ameliorates pathology of Alzheimer's disease model mice by improving microglial dysfunction // *Aging Cell*. – 2021. – Vol. 20, № 1. – P. e13286.
4. Strokotova A., Grigorieva E. Glucocorticoid effects on proteoglycans and glycosaminoglycans // *International Journal of Molecular Science*. – 2022. – Vol. 23, № 24. – P. 15678.
5. Oray M., Samra K., Meese H., et al. Long-term side effects of glucocorticoids // *Expert Opinion on Drug Safety*. – 2016. – Vol. 15, № 4. – P. 457–465.
6. McGavin M. Factors affecting visibility of a target tissue in histologic sections // *Veterinary Pathology*. – 2014. – Vol. 51, № 1. – P. 9–27.

УДК 615.015.21

Влияние полисахаридсодержащего комплекса из семян лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.) на развитие карциномы легких Льюис у мышей линии C57Bl/6 и эффективность цитостатической терапии

Л.А. Ан¹, О.Ю. Рыбалкина¹, А.К.Х. Али²

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Е.П. Зуева

¹Томский национальный исследовательский медицинский центр, НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга

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

²Сибирский государственный медицинский университет

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

E-mail: ahn_lyubov@mail.ru

Effect of a polysaccharide containing complex isolated from burdock seeds (*Arctium tomentosum* Mill.) on the development of Lewis lung carcinoma in C57Bl/6 mice and the effectiveness of cytostatic therapy

L.A. An¹, O.Yu. Rybalkina¹, A.Q.H. Ali²

Scientific Supervisor: Prof., Dr. E.P. Zueva

¹Tomsk National Research Medical Center GRI of Pharmacology and Regenerative Medicine, Russia, Tomsk, Lenin str., 3, 634028

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

E-mail: ahn_lyubov@mail.ru

Abstract. *The effect of an extract containing water-soluble polysaccharides from burdock (*Arctium tomentosum* Mill.) seeds on the growth and metastasis of Lewis lung carcinoma (LLC) in C57Bl/6 mice was studied. It was shown that a course of isolated administration of polysaccharides from burdock seeds significantly inhibits tumor growth by 17% (50 mg/kg) and 38 % (100 mg/kg), and also reduces the frequency of tumor metastasis, the area and number of metastases in the lungs of mice. The combined use of the polysaccharides with a single injection of cyclophosphamide (125 mg/kg) contributed to the improvement of the effect of chemotherapy.*

Key words: *Lewis lung carcinoma, *Arctium tomentosum* Mill., polysaccharides, cyclophosphamide.*

Введение

Онкологические заболевания по-прежнему являются одной из ведущих причин смертности населения во всем мире. Существующие терапевтические подходы к лечению злокачественных новообразований, в том числе лучевая и химиотерапия, демонстрируют недостаточную эффективность и нередко вызывают побочные эффекты, значительно снижающие качество жизни пациентов. В связи с этим является актуальным поиск и разработка средств, способных снижать токсическое действие химиотерапевтических препаратов на здоровые ткани и повышать эффективность терапии. Значительный интерес в данном контексте представляют растительные полисахариды, обладающие высокой биологической активностью и являющиеся перспективным источником получения новых фармакологически активных веществ.

Лопух войлочный (*Arctium tomentosum* Mill.) – двулетнее травянистое растение семейства астровых (Asteraceae). В официальной медицине корни лопуха войлочного наряду с лопухом большим (*A. lappa* L.) и лопухом малым (*A. minus* (Mill.) Bernh.) разрешены к заготовке и применению [1]. В экспериментальных исследованиях, посвященных изучению различных извлечений из лопуха войлочного, показано наличие гастропротекторных, адаптогенных, антиоксидантных, ранозаживляющих, противовоспалительных свойств выделенных биологически активных соединений [2–4]. В исследованиях *in vitro*

продемонстрировано цитотоксическое действие экстракта *A. tomentosum* на клеточных линиях опухолей человека HeLa, MCF7, A431 [5]. Обнаружено, что применение полисахаридов из листьев лопуха большого у крыс с индуцированной свиноцовой-укусусной анемией стимулирует процессы эритропоэза и иммунопоэза [6].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния полисахаридсодержащего экстракта из семян лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.) на развитие у мышей-самок линии C57Bl/6 карциномы легких Льюис и эффективность лечения циклофосфаном.

Экспериментальная часть

Эксперимент выполнен на 60 половозрелых мышах-самках линии C57Bl/6 массой 20–21 гр. Животные содержались в стандартных условиях вивария на обычном рационе питания со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры выполнялись в соответствии с международными правилами и нормами, были одобрены комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН (протокол №228012024 от 15.02.2024) [7].

Суммарный водный экстракт из семян лопуха войлочного, содержащий полисахаридный комплекс (ПСК) в качестве мажорного компонента (90,1 %), изготовлен на кафедре фармацевтического анализа СибГМУ. Оценку влияния экстракта на развитие перевиваемой опухоли проводили на экспериментальной модели карциномы легких Льюис (LLC) у мышей. Трансплантацию опухоли осуществляли взвесью опухолевых клеток ($4-5 \times 10^6$ клеток в 0,1 мл физиологического раствора) в мышцу левой задней лапы животного-реципиента. ПСК из семян лопуха войлочного вводили мышам внутрибрюшинно в дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг в течение 9 дней, начиная с 7 сут после перевивки опухоли. В качестве химиотерапевтического средства использовали циклофосфамид (ЦФ; «Эндоксан», ЗАО компания «Бакстер», Россия) в дозе 125 мг/кг, который вводили однократно внутрибрюшинно в 0,1 мл физиологического раствора на 10 сут после трансплантации опухоли. По окончании эксперимента (на 17 сут) оценивали эффективность применяемых лечебных воздействий по противоопухолевому и противометастатическому действию препаратов: определяли массу опухоли, процент торможения ее роста (ТРО), количество метастазов в легких и их площадь, частоту метастазирования, индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) [8].

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v. 8.0.1 («GraphPad Software», США). Соответствие выборок закону нормального распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Данные представлены в виде $M \pm SD$ (M – среднее значение, SD – стандартное отклонение). Ввиду смешанности выборок по характеру распределения при парных сравнениях использовали непараметрический U-тест Манна-Уитни, при множественных сравнениях – H-тест Краскала-Уоллиса. Для оценки статистической значимости различий качественных показателей использовали угловое преобразование Фишера (ϕ). Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$ [9].

Результаты

Изолированное курсовое применение у мышей с карциномой легких Льюис ПСК из семян лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.) вызывало статистически значимое уменьшение массы первичного опухолевого узла в 1,2 (в дозе 50 мг/кг) и 1,6 раза (100 мг/кг) в сравнении с показателями у животных контрольной группы. Под влиянием курсового применения ПСК в дозах 50 и 100 мг/кг в легких животных отмечено уменьшение количества метастатических узлов (12,2 раза и 17,1 раза) и их площади (в 4,0 и 6,3 раза). Кроме того, частота метастазирования в группах животных, получавших ПСК в дозе 50 мг/кг, снизилась до 70 % (против 100 % в контроле), а в большей дозе этот показатель уменьшился до 56 %

($P < 0,01$). ИИМ в группе мышей, леченых ПСК в дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг, составил 83 % и 93 % соответственно.

Однократное введение мышам с LLC ЦФ в дозе 125 мг/кг на 10 сут эксперимента полностью ингибировало процесс метастазирования опухоли у животных. Кроме того, под действием ЦФ средняя масса опухоли мышей оказалась снижена на 40 % относительно контрольных значений ($P < 0,01$).

Сочетанное применение ПСК из семян лопуха войлочного с ЦФ способствовало повышению антибластомного действия цитостатика: показатель ТРО в группе животных, получавших ПСК в дозе 50 мг/кг, был равен 70 %, а в дозе 100 мг/кг оказался наивысшим и составил 77 % ($P < 0,01$).

Заключение

Таким образом, в эксперименте на мышах с карциномой легких Льюис обнаружено, что курсовое изолированное применение полисахаридсодержащего комплекса из семян лопуха войлочного в дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг приводит к торможению роста опухоли и ее метастазирования. Сочетанное применение ПСК в дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг с циклофосфамидом приводит к усилению антибластомного эффекта циклофосфамида.

Список литературы

1. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том 4 // Федеральная электронная медицинская библиотека: сайт. – 2018. – URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения 27.02.2025)
2. Жданов В.Н. Влияние извлечений из лопуха войлочного на токсические эффекты этанола и гипоксию: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / В. Н. Жданов. – Томск, 1999. – 20 с.
3. Вымятина З.К. Влияние экстракта из семян *Arctium tomentosum* Mill. На функциональное состояние желудка у собак и тонкого кишечника у крыс // Растит. ресурсы. – 2000. – Т. 36, № 3. – С. 59–64.
4. Поветьева Т.Н., Пашинский В.Г., Дудко В.В. Противовоспалительные свойства сухих экстрактов из корней и листьев *Arctium tomentosum* Mill // Растит. ресурсы. – 2001. – № 2. – С. 80–85.
5. Csupor-Loffler B., Hajdu Z., Rethy B. et al. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cells lines. Part II / B. Csupor-Loffler, // J. Phytother. Res. – 2009. – Vol. 23. – P. 1109–1115.
6. Кокина Д.Г., Сычев И.А. Действие полисахарида листьев лопуха большого на эритропоз в условиях железодефицитной анемии // Современные проблемы науки и образования. – 2022. – № 5. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=32048> (дата обращения: 27.02.2025).
7. Директива Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях от 2010 г. № 2010/63/EU. – Санкт-Петербург: НП «Объединение специалистов по работе с лабораторными животными», 2012.
8. Софьина З.П., Сыркин А.Б., Голдин А., Кляйн А. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. – М.: Медицина, 1980. – 296 с.
9. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л.: Медицина, 1978. – 296 с.

УДК 612.1/8

**Сравнительный анализ роли лимфоцитов в поляризации макрофагов кишечника
мышей *Muc2*^{-/-} на разных этапах онтогенеза**

В.Д. Бец, К.М. Ачасова, Е.П. Гончарова

Научный руководитель: к.б.н., Е.А. Литвинова

Новосибирский государственный технический университет,

Россия, г. Новосибирск, пр. Карла Маркса 20, 630073

E-mail: betsvd.bio@gmail.com

**Comparative analysis of the role of lymphocytes in the polarization of intestinal macrophages
of *Muc2*^{-/-} mice at different stages of ontogeny**

V.D. Bets, K.M. Achasova, E.P. Goncharova

Scientific Supervisor: Ph.D. E.A. Litvinova

Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia, Karl Marx str., 20, 630073

E-mail: betsvd.bio@gmail.com

Abstract. *Inflammation induced by factors such as metalloproteinases, reactive oxygen species and nitric oxide can compromise the integrity of the intestinal barrier, exacerbating immune responses and promoting chronic disease. Fortunately, animal models, particularly mouse models, provide invaluable insight into these mechanisms. Through such studies, we can uncover the pathways underlying chronic inflammation, identify critical periods of development, and discover metabolites that may mitigate inflammation or prevent the progression of chronic disease.*

Key words: *macrophages, polarisation, T cells, B cells, inflammation, mucin 2.*

Введение

Актуальность данного исследования заключается в изучении возрастных изменений иммунных и воспалительных процессов в кишечнике мышей с дефицитом муцина-2 (*Muc2*^{-/-}), что является моделью для понимания патогенеза воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) и аллергических реакций [1–3]. ВЗК и аллергии представляют собой серьезные медицинские проблемы, особенно в раннем постнатальном периоде, когда иммунная система активно развивается и адаптируется к новым антигенным воздействиям, таким как переход на твердую пищу [9]. Изучение взаимодействия микробиома, макрофагов и Т-клеток является важным направлением в понимании механизмов развития воспалительных заболеваний [4–8]. Современные модели, включая генетически модифицированных мышей, позволяют исследовать критические моменты онтогенеза и переход от острого к хроническому воспалению [10].

Экспериментальная часть

В исследовании использованы мыши SPF-статуса, подтвержденного ежеквартально по стандартам FELASA. Мыши линии *Muc2*^{-/-} получены из ФИЦ «Основы биотехнологии» РАН. *Muc2*^{+/-} получены скрещиванием *Muc2*^{-/-} (C57BL/6) с C57BL/6. В эксперименте использованы *Muc2*^{-/-}, *Scid* и *Muc2*^{+/+} (контроль). Животные содержались однопольными группами по 6 особей в индивидуально – вентилируемых клетках Optimise, в режиме температуры 20–22 °С, влажности 30–60 %, света 14/10 ч. Кормление осуществлялось автоклавированным кормом и стерильной водой без ограничений.

Для проведения гистологического анализа ткани фиксировали в 10 % формалине, заливали в парафин. Срезы (4 мкм) окрашивали PAS для оценки морфологии и секреции бокаловидных клеток. Количество эпителиальных клеток на крипту подсчитывали в 15 случайных криптах. Макрофаги и эозинофилы оценивали в срезах, окрашенных азур-П-эозином, при увеличении ×1000.

Для проведения ПЦР в реальном времени общую РНК выделяли с использованием TRIzol, концентрацию измеряли на NanoDrop 2000. Обратную транскрипцию проводили с M-MuLV RT, используя случайные гексамеры и Oligo-dT. ПЦР выполняли с BioMaster HS-qPCR SYBR Blue на CFX96 Touch™. Экспрессию генов нормализовали по *Tubb5* ($\Delta Ct = 2^{(CtTubb5 - Ctgene)}$).

Статистический анализ данных проводили с помощью ПО IBM SPSS Statistics 23 и Past 4. Нормальность распределения оценивали критерием Колмогорова-Смирнова. Данные анализировали с использованием One-way PERMANOVA (ненормальное распределение) и Two-way PERMANOVA (многофакторный анализ). Уровень значимости – $p \leq 0,05$.

Результаты

Исследование демонстрирует, что уже на 14-й день жизни у мышей *Muc2*^{-/-} наблюдаются стойкие изменения в структуре кишечника, включая увеличение количества макрофагов и эозинофилов, что может свидетельствовать о начале воспалительных и аллергических процессов. Эти изменения особенно важны, так как они совпадают с критическими периодами развития, такими как начало потребления твердой пищи, что может влиять на формирование микробиоты и иммунного ответа.

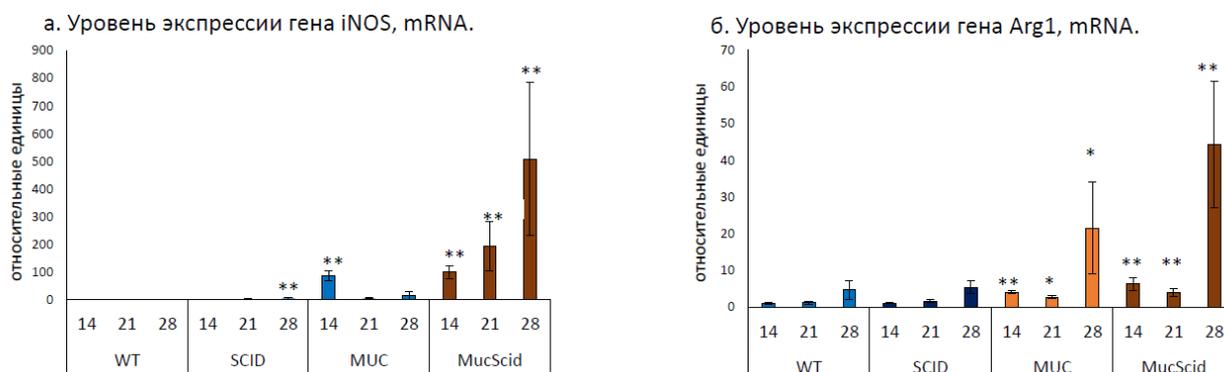


Рис. 1. Особенности возрастных изменений экспрессии генов метаболитов макрофагов в нисходящем отделе толстой кишки у мышей с нуль-мутацией гена *Muc2* и точечной мутацией *Scid* в гене *Prcdc*. Экспрессия генов ферментов макрофагов M1 – индуцированная NO-синтаза (iNOS) (а) и M2 – аргиназа 1 (*Arg1*) (б); * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$

Кроме того, работа раскрывает механизмы поляризации макрофагов, ключевых клеток иммунной системы, и их роль в регуляции воспаления. Установлено, что у мышей *Muc2*^{-/-} происходит переключение макрофагов с провоспалительного (M1) на противовоспалительный (M2) тип (рис.1), что может быть связано с регуляторными механизмами, включающими зрелые лимфоциты. Это открытие важно для понимания того, как иммунная система контролирует воспаление и предотвращает его хронизацию.

Использование мышиных моделей с двойными мутациями (*Muc2*^{-/-} и *Scid*) позволило выявить, что зрелые лимфоциты играют значительную роль в подавлении провоспалительных реакций. Это подчеркивает сложность взаимодействий между иммунными клетками и их влияние на развитие хронических заболеваний.

Заключение

Наши экспериментальные работы демонстрируют развитие хронического воспаления, ассоциированное с повышением числа макрофагов и стабильным подъемом как про-, так и противовоспалительных факторов у мышей с признаками ВЗК. В отличие от людей с ВЗК, воспаление у мышей с врожденной патологией начинается в постнатальный период до 14 дней и переходит в хроническую стадию примерно в возрасте 21-го дня. Эксперименты

на иммунодефицитных мышцах показали, что для активации макрофагов не требуется присутствие зрелых Т и В клеток.

Таким образом, данное исследование актуально, так как оно не только углубляет понимание механизмов развития ВЗК и аллергий, но и предоставляет потенциальные мишени для терапевтического вмешательства, направленного на предотвращение хронизации воспаления и улучшение качества жизни пациентов с подобными патологиями.

Список литературы

1. Kaplan G.G., Ng S.C. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease // *Gastroenterology*. – 2017. – Vol. 152, № 2. – P. 313. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.020.
2. Molodecky N.A., Soon I.S., Rabi D.M., Ghali W.A., et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review // *Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 142, № 1. – P. 46. – doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001.3.
3. Hine A.M., Loke P. Intestinal Macrophages in Resolving Inflammation // *The Journal of Immunology*. – 2019. – Vol. 203, № 3. – P. 593. – doi:10.4049/jimmunol.1900345.
4. Na Y.R., Stakenborg M., Seok S.H., Matteoli G. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2019. – Vol. 16. – P. 531. – doi:10.1038/s41575-019-0172-4.
5. Sica A., Larghi P., Mancino A., Rubino L., et al. Macrophage polarization in tumour progression // *Seminars in Cancer Biology*. – 2008. – Vol. 18, № 5. – P. 346. – doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.004.
6. Stout R.D. Suttles J. T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease // *Frontiers in Bioscience*. – 1997. – Vol. 2, № 4. – P. 197. – doi:10.2741/A183.
7. Chan T. Pek E.A., Huth K., Ashkar A.A. CD4+ T-cells are important in regulating macrophage polarization in C57BL/6 wild-type mice // *Cellular Immunology*. – 2011. – Vol. 266, № 2. – P. 180. – doi:10.1016/j.cellimm.2010.10.002.
8. Ruytinx P., Ruytinx P., Proost P., van Damme J., Struyf S. Chemokine-induced macrophage polarization in inflammatory conditions // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1930. – doi:10.3389/fimmu.2018.01930.
9. Parisi L., Gini D., Baci M., Tremolati M., Fanuli B., et al. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? // *Journal of Immunology Research*. – 2018. – Vol. 2018, № 1. – doi:10.1155/2018/8917804.
10. Ke J., Li Y., Han C., He R., Lin R., Qian W., Xiaohua H. Fucose Ameliorate Intestinal Inflammation Through Modulating the Crosstalk Between Bile Acids and Gut Microbiota in a Chronic Colitis Murine Model // *Inflammatory Bowel Diseases*. – 2020. – Vol. 26, № 6. – P. 863. – doi.org/10.1093/ibd/izaa007

УДК 616-092

Особенности адаптационного потенциала студенток из Китайской Народной Республики

К.В. Бодягина, Э.Э. Нистор, И.П. Сюзева
Научный руководитель: к.б.н. Н.Г. Елманова
Тюменский государственный медицинский университет
Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, д. 54, 625023
E-mail: bodyagina2002@inbox.ru

Features of adaptation potential of female students from the People's Republic of China

K.V. Bodyagina, I.P. Syuzeva, E.E. Nistor
Scientific Supervisor: Ph.D. N.G. Elmanova
Tyumen State Medical University, Russia, Tyumen, Odesskaya str., 54, 625023
E-mail: bodyagina2002@inbox.ru

Abstract. *Recently, the importance of effective adaptation of students to new socio-cultural conditions for successful educational process has been emphasized. Difficulties associated with adaptation to a new environment can negatively affect the health and academic performance of international students. The aim of the study was to conduct a comparative analysis of the physical and psycho-emotional state of female students from the People's Republic of China who entered Tyumen State Medical University in 2023 and 2024. The study involved 30 female students, 14 of whom entered in 2023 and 16 in 2024. Methods were used to assess the quality of life (SF-36 questionnaire), nervous system strength (Tepping test), psychophysiological status, anxiety (Spielberger-Hanin test) and anthropometric measurements. The results showed that female students of 2024 had lower quality of life scores on all criteria and their mental health suffered due to higher levels of situational anxiety. Statistically significant differences in blood pressure indicate a lack of adaptation in this group, as well as the predominance of sympathetic tone of the nervous system, which may slow down adaptation processes. Whereas female students of 2023 showed a satisfactory state of health and successful adaptation mechanisms. In conclusion, it is emphasised that 2024 female students need more time for adaptation, as well as an individual approach to prevent stress and disorders of adaptation mechanisms. The need for in-depth monitoring of the health and psycho-emotional status of these female students becomes evident to ensure their successful integration into the educational process.*
Key words: *adaptation potential, Kerdo index, Spielberger–Khanin test, tapping-test.*

Введение

Адаптация к новым социокультурной, языковой средам и климатическим условиям может быть сложной, длительной и значительно влиять на успешность образовательного процесса. Адекватная адаптация способствует быстрому включению студентов в учебный процесс, повышению качества их подготовки и сохранению контингента учащихся. Однако приспособление организма к непривычным условиям, таким как смена часовых поясов, новый быт и взаимодействие с социумом с другим культурным кодом может быть затруднено из-за физиологических особенностей индивидуумов, что может привести к снижению успеваемости и ухудшению здоровья студентов [1]. Таким образом, эффективная оценка адаптационного потенциала поможет правильно выстроить мероприятия по улучшению состояния здоровья, и избежать возможный переход в дезадаптацию, а также предотвратить угнетение когнитивный способностей иностранных студентов, что положительно скажется на общей успеваемости.

Целью исследования стало провести сравнительный анализ физического и психоэмоционального состояния студентов из Китайской Народной республики, поступивших в Тюменский ГМУ в 2023 и 2024 гг.

Экспериментальная часть

В исследовании приняли участие 30 студентов женского пола из Китайской народной республики (КНР), которые поступили в Тюменский ГМУ в 2023 и 2024 годах. На момент исследования все наблюдаемые были студентами 1-го года обучения. В 1 группу вошло 14 девушек, которые поступили в Тюменский ГМУ в 2023 году, их средний возраст составил 19 ± 1 лет. Во 2 группу вошло 16 студенток, поступивших в 2024 году, их средний возраст составил 18 ± 1 лет. Качество жизни обследуемых оценивали с помощью опросника SF-36.

С использованием «Теппинг-теста» была оценена сила нервной системы (НС) и ее реакция на психоэмоциональное напряжение. На основе показаний активациометра оценивали психофизиологический статус и свойства нервной системы. Для оценки ситуативной и личностной тревожности проводили тест Спилбергера–Ханина. У студенток измеряли антропометрические параметры: рост, вес, на основе чего рассчитывали индекс массы тела (ИМТ); подсчитывали частоту сердечных сокращений (ЧСС), измеряли систолическое и диастолическое артериальное давление (АД) до и после физической нагрузки. По полученным показателям рассчитывали вегетативный индекс Кердо (ВИК), индекс функциональных изменений (ИФИ) для оценки адаптационного потенциала сердечно-сосудистой системы (ССС).

Статистическую обработку проводили в Statistica 6.0. Результаты, которые не подчинялись закону нормального распределения, были представлены в виде медианы (Me) интерквартильного размаха в 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Для оценки достоверности различий между выборками применяли непараметрический критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Результаты

Достоверных различий между показателями возраста, роста, массы тела и индекса массы тела (ИМТ) у китайских студенток, поступивших в вуз в 2023 и 2024 гг., обнаружено не было. При оценке результатов опросника SF-36 установлено, что качество жизни поступивших в вуз в 2024 году студенток ниже, чем у поступивших ранее, по всем показателям. При анализе результатов необходимо подчеркнуть, что более высокие показатели (> 75 баллов) указывают на более высокую степень удовлетворенностью жизнью. Были выявлены статистически значимые отличия в следующих показателях: физическое функционирование (PF), социальное функционирование (SF), жизненная активность (VT) и психическое здоровье (MN). В 2023 году все показатели были выше 75, особенно жизненная активность и психическое здоровье, которые достигли 100 баллов, что говорило об отличном состоянии студенток. В 2024 году показатели PF и SF превышали 75, что говорило о хорошем состоянии студенток. Особенно низкими были значения VT и MN (< 75 баллов), что указывало на угнетение физического и психоэмоционального здоровья.

Студентки 2024 и 2023 годов поступления имели два типа силы нервной системы (НС): слабая и средне-слабая, которые встречались с одинаковой частотой в обеих группой.

В ходе анализа теста Спилбергера–Ханина было выявлено, что личностная тревожность (ЛТ) имела умеренные и высокие уровни у студенток 2024 и 2023 гг. поступления в равных пропорциях. Однако были обнаружены различия в уровнях ситуативной тревожности (СТ). Среди поступивших в 2024 году преобладал умеренный уровень СТ (57 %), а у 43 % студенток наблюдалась низкая СТ; в 2023 года преобладала низкая СТ (78,6 %), а у 21,4 % была умеренная СТ. У студенток 2024 года поступления наблюдалась более высокая СТ по сравнению с группой 2023 года ($p = 0,043$), что подтверждает значимую негативную психоэмоциональную реакцию на внешние факторы среды, с чем скорее всего связано снижение показателей психического здоровья.

Значения АД было статистически значимо ниже у студенток 2024 г., САД студенток 2024 г. составило Me = 98 мм.рт.ст. (90;113), у студенток 2023 г. набора было Me = 114 мм.рт.ст. (105;128) ($p = 0,043$). ДАД студенток 2024 г. имело более низкое значение, где Me = 70 мм.рт.ст. (60;75) по сравнению с показателями студенток 2023 г. набора, где Me = 78 мм.рт.ст. (75;85) ($p = 0,004$).

При этом параметры ЧСС не имели отличий. Анализ значений ИФИ показал, что студентки 2024 г. поступления имеют напряжение механизмов адаптации ССС ($Me = 3,05$ ед., (2,87;3,19)); у 5 студенток наблюдалась неудовлетворительная ситуация, где ИФИ – $Me = 3,19$ ед., (3,13;3,20)), а у 2 студенток – срыв механизмов адаптации ССС ($Me = 3,57$ ед. (3,54;3,53)). А у всех студенток 2023 г. была удовлетворительная адаптация, так как ИФИ составил $Me = 2,08$ ед. (1,58;2,33). Видимо, неудовлетворительно сформированные механизмы адаптации у студенток 2024 года поступления обусловили снижение показателей жизненной активности.

При оценке вегетативного статуса на основании величины ВИК установлено, что у большинства студенток 2023 г. в 71 % случаев были уравновешены парасимпатическая НС (ПНС) и симпатическая НС (СНС), у 21 % студенток отмечалось преобладание СНС, и в 8 % студенток была выраженная парасимпатикотония. Однако у студенток 2024 года уравновешенность состояния ПНС и СНС была только у 43 %, у 57 % студенток нашли преобладание тонуса СНС. У группы 2024 года у большинства ВИК выявил преобладание СНС, где $Me = 18,3$ (7,3;26,1) (уравновешенность ПНС и СНС-СНС)), а у студенток 2023 года была уравновешенность парасимпатической НС и симпатической НС, где $Me = (-0,77)$ ((-15,6);10,9) (уравновешенность ПНС и СНС)) ($p = 0,002$). Уравновешенность вегетативной НС способствует адекватной адаптации. Преобладание симпатической НС способствует формированию дизэргических реакций.

Заключение

У студенток 2024 года поступления было выявлено сниженное качество жизни. Психическое здоровье было снижено, что подтверждалось увеличением уровня СТ. Более низкий уровень жизненной активности был связан с напряжением механизмов адаптации. Неуравновешенное преобладание симпатического тонуса ВНС замедляет процессы адаптации. Студенткам 2024 года поступления требуется большее время на адаптацию к обучению в ВУЗе. Студенты требуют более детального подхода и наблюдения с целью профилактики нарушений адаптационных механизмов и предотвращения развития болезней стресса.

Список литературы

1. Сафонова В.В., Дорофеев В.В., Бажина И.А. Исследование влияния типа нервной системы на восстановление организма. // Ученые записки университета Лесгафта. – 2023. – № 4 (218). – С. 359–363.

УДК 615.322 : 576.08 : 576.5

Сесквитерпеновые лактоны как модуляторы агрегации белка TDP-43

М.В. Бурак

Научный руководитель: д.б.н. М.С. Кухарский

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова

Россия, г. Москва, ул. Островитянова, 1, 117513

E-mail: burakmarina23@mail.ru

Sesquiterpene lactones as modulators of TDP-43 protein aggregation

M.V. Burak

Scientific Supervisor: Dr. M.S. Kukharsky

Pirogov Russian National Research Medical University, Russia, Moscow, Ostrovityanova str., 1, 117513

E-mail: burakmarina23@mail.ru

Abstract. *TDP-43 protein is a nuclear DNA/RNA-binding protein that plays an important role in RNA metabolism. Specificity of its structure and excessive accumulation of TDP-43 in the cytoplasm leads to disruption of its functions and formation of aggregates. This phenomenon is observed in amyotrophic lateral sclerosis and a number of other neurodegenerative diseases – a group of disorders of the nervous system, which are based on the destruction of neurons. The exact mechanisms of aggregation and ways to protect cells from it have not yet been established. Sesquiterpene lactones, a class of compounds with a wide spectrum of pharmacological activity capable of neuroprotection, can be considered as potential antiaggregating substances. In our study, five compounds from the class of sesquiterpene lactones were tested for their antiaggregation activity against TDP-43 protein. SH-SY5Y cell culture was used as a model, in which pathological protein aggregation was induced by transfection of cell cultures with a plasmid vector encoding a mutant form of human TDP-43 protein fused to the fluorescent protein GFP for aggregate detection. Analysis of cell cultures after transfection and addition of the tested compounds showed that compounds L04-6037 and L03-6037 significantly reduced aggregation of TDP-43 protein, probably due to direct interaction with the protein, as shown by docking. Other compounds SAV88, L01-T10 u L02-5272 did not have this activity.*

Key words: *TDP-43, aggregation, sesquiterpene lactones, docking.*

Введение

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) – гетерогенная группа расстройств нервной системы, в основе развития которых лежит гибель нейронов [1]. НДЗ являются одной из острейших медицинских и социальных проблем, это обусловлено тяжелой физической и психической инвалидизацией пациентов, а также возраст-зависимым характером проявления симптомов.

Важным звеном патогенеза НДЗ является формирование нерастворимых белковых включений или агрегатов, которые оказывают токсический эффект на клетки нервной системы. Гистопатологические отложения белка TDP-43 обнаруживаются при ряде НДЗ, таких как боковой амиотрофический склероз, фронтотемпоральная деменция, болезнь Альцгеймера и др. [1].

TDP-43 – ядерный ДНК/РНК-связывающий белок, который участвует в регуляции транскрипции, альтернативном сплайсинге, стабилизации и транспорте мРНК, образовании рибонуклеопротеиновых комплексов и экспрессируется во всех клетках. Особенности структуры С-концевого домена, увеличение экспрессии TDP-43 и другие причины приводят к образованию белком токсичных агрегатов и как следствие к гибели клеток. Точечные мутации в TDP-43 генетически ассоциированы с различными НДЗ [2].

В настоящее время механизмы белковой агрегации, а также способы защиты клеток от токсичных агрегатов до конца не изучены. Все составляющие сложного каскадного процесса

агрегации белков могут рассматриваться в качестве потенциальных мишеней для нейропротекторных соединений, воздействующих на главные патогенетические звенья НДЗ.

В качестве таких защитных соединений могут быть рассмотрены сесквитерпеновые лактоны – это один из крупнейших классов вторичных метаболитов растений семейства *Asteraceae*. Эти соединения представляют собой 15-углеродный скелет с тремя изопреновыми единицами, за которыми следует лактонное кольцо. Данные соединения обладают широким спектром фармакологической активности: противомаларийной, противоопухолевой, противовоспалительной, антибактериальной и др. В исследованиях последних лет появляется все больше сведений о наличии у данных соединений нейропротекторной активности [3].

Целью исследования являлось определение влияния ряда сесквитерпеновых лактонов на процесс агрегации белка TDP-43 в модели *in vitro* в условиях индуцированной патологической белковой агрегации.

Экспериментальная часть

В качестве соединений с потенциальными нейропротекторными свойствами были проверены пять сесквитерпеновых лактонов из собственной библиотеки соединений.

Оценка наличия антиагрегационных свойств у соединений проводилась на клеточной культуре SH-SY5Y. Моделирование патологической белковой агрегации осуществлялось путем 24-часовой трансфекции клеточных культур плазмидным вектором, кодирующим мутантную форму белка TDP-43-T5 (d1-161) человека и слитым с флуоресцентным белком GFP для детекции агрегатов. Укороченная форма белка TDP-43-T5 имеет повышенную склонность к агрегации и часто обнаруживается в составе агрегатов у пациентов с НДЗ.

В опытные образцы через 4 часа после начала трансфекции добавлялись исследуемые вещества (SAV88, L01-T10, L04-6037, L03-6037, L02-5272) в концентрации 1 мкМ. Через 24 часа после трансфекции проводились фиксация опытных и контрольных клеток и микроскопирование. Анализ изображений проводился в программе ImageJ.

Также проводился докинг с использованием программного обеспечения AutoDock Vina исследуемых сесквитерпеновых лактонов с белком TDP-43 с целью выявления возможного прямого взаимодействия между соединениями и белком.

Результаты

На микрофотографиях опытных и контрольных культур (рис. 1) были посчитаны показатели, отражающие степень агрегации белка в клеточных культурах: интенсивность флуоресценции белка TDP-43-T5 (рис. 2, а) и клетки, содержащие агрегаты (рис. 2, б).

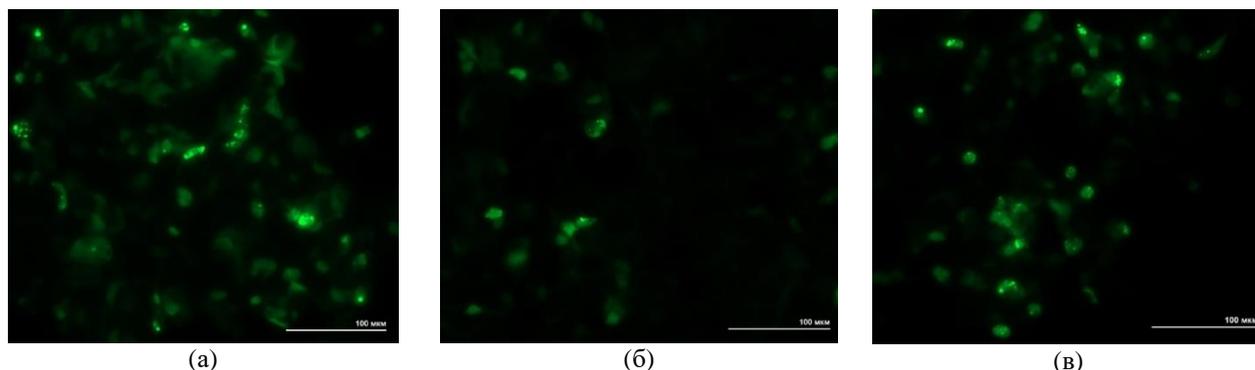


Рис. 1. Репрезентативные фотографии культур после трансфекции вектором EGFP-TDP-43-T5: контрольные культуры (а); опытные культуры с добавлением соединений L04-6037, L03-6037 (б); опытные культуры с добавлением соединений SAV88, L01-T10, L02-5272 (в)

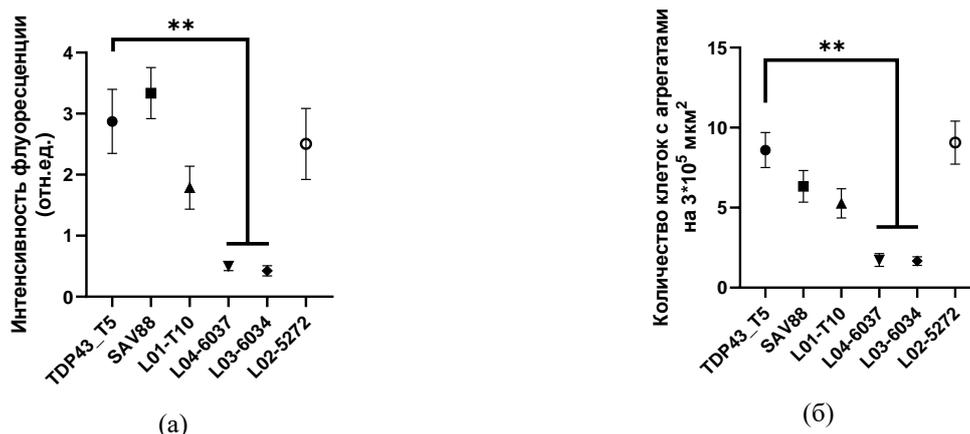


Рис. 2. Оценка степени агрегации белка TDP-43-T5 в клеточных культурах: оценка интенсивности флуоресценции белка TDP-43-T5 (а); оценка количества клеток с агрегатами белка TDP-43 T5 на $3 \cdot 10^5 \text{ мкм}^2$ (б). Изображены среднее и стандартная ошибка среднего. Непараметрический критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, ** - $p < 0.01$

Было показано, что соединения L04-6037 и L03-6037 (рис. 3) значительно уменьшают интенсивность флуоресценции белка TDP-43-T5 и снижают число клеток с агрегатами в трансфицированных культурах клеток. Соединения SAV88, L01-T10 и L02-5272 таким свойством не обладали.

Докинг сесквитерпеновых лактонов с белком TDP-43 показал, что соединения L04-6037 и L03-6037 с высокой вероятностью (оценочные функции = -9,4 и -10,4) связываются со вторым РНК-связывающем доменом белка TDP-43. В образовании комплекса белок-лиганд участвуют аминокислотные остатки 192 Lys, 194 Phe, 221 Phe, 231 Phe, 261 Glu, 263 Lys. Вероятность связывания других соединений мала.



Рис. 3. Структуры сесквитерпеновых лактонов: соединение L04-6037 (а); соединение L03-6037 (б)

Заключение

В результате проведенных исследований было показано, что соединения из класса сесквитерпеновых лактонов L04-6037 и L03-6037 обладают антиагрегационной активностью в отношении белка TDP-43. Вероятно, данный эффект обусловлен прямым взаимодействием соединений с белком TDP-43.

Список литературы

1. Dugger B.N., Dickson D.W. Pathology of Neurodegenerative Diseases // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2017. – V. 9, №7. – P. 1–23.
2. Corbet G.A., Wheeler J.R., Parker R., Weskamp K. TDP43 ribonucleoprotein granules: physiologic function to pathologic aggregates // RNA Biol. – 2021. – V. 18, № sup1. – P. 128–138.
3. Ahuja A., Yi Y.S., Kim M.Y., Cho J.Y. Ethnopharmacological properties of Artemisia asiatica: A comprehensive review // Journal of Ethnopharmacol. – 2018. – V. 220. – P. 117–128.

УДК 577.218

Альтернативный сплайсинг в патогенетике задержки роста плодаМ.М. Гавриленко, А.А. Бабовская, Е.В. Ижойкина

Научный руководитель: академик РАН, профессор, д.б.н. В.А. Степанов

Научный консультант: к.м.н. Е.А. Трифонова

Томский национальный исследовательский медицинский центр, НИИ медицинской генетики
Россия, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10, 634050E-mail: maria.gavrilenko@medgenetics.ru**Alternative splicing in the pathogenetics of fetal growth restriction**M.M. Gavrilenko, A.A. Babovskaya, E.V. Izhoikina

Scientific Supervisor: Academician of the RAS, Prof., Dr. V.A. Stepanov

Scientific Consultant: Ph.D. E.A. Trifonova

Tomsk National Research Medical Center, RI of Medical Genetics, Russia, Tomsk, Ushayki River
Embankment str., 10, 634050E-mail: maria.gavrilenko@medgenetics.ru

Abstract. *Alternative splicing (AS) is a key post-transcriptional regulatory mechanism that increases transcriptome and proteome diversity. This study investigates the role of AS in the pathogenesis of fetal growth restriction by analyzing AS events in the placenta decidual cells. We conducted a deep whole transcriptome RNA sequencing on samples from 8 women with physiological pregnancy and 8 women with fetal growth restriction. The results revealed 8,770 AS events in 5,411 genes in the fetal growth restriction group. The most common AS types were exon skipping for annotated events and intron retention for de novo events. During the analysis of differential alternative splicing between the groups, 51 genes were identified. These genes involved in DNA repair, actin binding, the fibroblast growth factor signaling pathway, and the Wnt signaling pathway, whose disruption may contribute to the fetal growth restriction development, as they play a crucial role in maintaining physiological pregnancy. It was found that among these genes, SENP7 and CUL4B are the most susceptible to alternative splicing.*

Keywords: *alternative splicing, placenta, decidual cells, fetal growth restriction.*

Введение

Альтернативный сплайсинг – это механизм посттранскрипционной модификации РНК, при котором один и тот же первичный транскрипт (пре-мРНК) может подвергаться различным преобразованиям, формируя разные варианты зрелой мРНК и увеличивая белковое разнообразие без изменения ДНК. Ряд исследований показал, что гены, подверженные АС, могут играть важную роль в патогенезе многофакторных заболеваний: онкологических, неврологических, акушерских и др. [1–3]. Актуальным представляется изучение ландшафта АС в клетках, которые непосредственно участвуют в развитии патологии, так как данный молекулярный механизм является клеткоспецифичным [4]. Децидуальные клетки (ДК) плаценты играют ключевую роль в поддержании физиологической беременности (ФБ), участвуя в процессах гемостаза, воспалении и иммунном ответе, их дисфункция может привести к развитию акушерских патологий, в том числе, к задержке роста плода (ЗРП) [5]. Стоит отметить, что ранее не проводился полнотранскриптомный скрининг изменений АС в отдельных клеточных популяциях плацентарной ткани, поэтому целью данного исследования является анализ и характеристика событий альтернативного сплайсинга в ДК при физиологической беременности и задержке роста плода.

Экспериментальная часть

Объем выборки составил 8 женщин с ФБ и 8 женщин с выраженной ЗРП. Группы сопоставимы по основным клиническим и антропометрическим характеристикам. Сбор биоптатов материнской части плаценты осуществлен по стандартной методике акушерами-гинекологами на базе ОГАУЗ «ОПЦ им. И.Д. Евтушенко» г. Томска. Проведение настоящего исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института медицинской генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр». С каждого индивидуального биоптата плацентарной ткани получен пул 1500 ДК, выделена РНК, синтезированы библиотеки (см. подробнее [6]). Секвенирование библиотек проведено в режиме двухконцевого прочтения на платформе Illumina Next-seq 2000 (2x100 п.о.) с расчетным числом прочтений на образец не менее 60 млн. Анализ событий альтернативного сплайсинга выполнен с помощью программы «MAJIQ», которая идентифицирует бинарные события АС и комплексные (события, состоящие из нескольких бинарных событий) [7].

Результаты

В группе ЗРП идентифицировано 8770 событий АС для 5411 генов, тогда как при ФБ выявлено 6489 событий для 4195 генов, что может говорить о более широком ландшафте альтернативного сплайсинга при заболевании. Из выявленных событий АС в группе с ЗРП: комплексных – 2113 (24,1 %), бинарных – 6657 (75,9 %). Наиболее распространенным типом АС для аннотированных бинарных событий является пропуск экзона (33,1 %), тогда как для *de novo* – удержание интрона (74,6 %), что согласуется как с уже давно известным положением о преобладании пропуска экзона у млекопитающих, так и с ростом событий удержания интрона согласно последним данным [8]. Генами, наиболее подверженными АС в группе с ЗРП, согласно процентному индексу сплайсинга (PSI), являются *BAZ2B*, *ESRP2*, *LLGL2*, *MCTP2*, *RAB7A*, *RNF126*, *UEVLD*, вовлеченные в такие биологические процессы как сигнальный путь ERBB (GO:0038127), цитозольный транспорт (GO:0016482), эндосомальный транспорт (GO:0016197). Сигнальный путь ErbB играет решающую роль в различных клеточных процессах, включая рост, пролиферацию, дифференцировку и выживание клеток [9]. Обнаружено, что комплексные события имеют более многогранную и сложную структуру при ЗРП, чем при ФБ. Так, ген *DDX60L*, имеющий наибольшее количество событий АС в обеих группах, при ЗРП более подвержен АС (рис. 1).

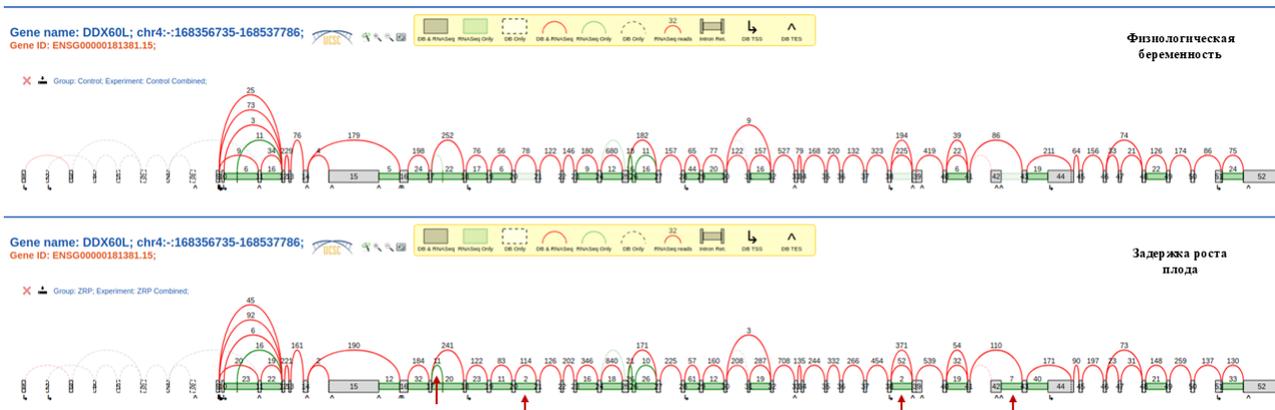


Рис. 1. Сравнение структуры событий АС гена *DDX60L* в группах с ФБ и ЗРП

В ходе анализа дифференциального АС между ФБ и ЗРП идентифицирован 51 ген, вовлеченный в репарацию ДНК (GO:0006289), связывание актина (GO:0003779), сигнальный путь факторов роста фибробластов (P00021), сигнальный путь Wnt (P00057) и др. Выявлено, что среди дифференциально альтернативно сплайсированных генов *SENP7* (PSI = 0,5941) и

CUL4B (PSI = 0,4814) наиболее подвержены АС. Интересно, что ген *SENP7* программирует архитектуру мейоза и выживание эмбрионов у мышей [10]. В свою очередь, также на мышах показано, что недостаток *Cul4b*, компонента убиквитинлигазы E3, приводит к гибели эмбрионов и аномальному развитию плаценты [11]. Кроме того, опыт на культуре клеток показал влияние *Cul4B* на рост нервных клеток-предшественников [12].

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что альтернативный сплайсинг играет важную роль в молекулярных механизмах развития задержки роста плода, а выявленные гены являются перспективными маркерами для дальнейшего изучения данного заболевания.

Исследование выполнено за счет средств государственного задания по теме ФНИ № 122020200083-8.

Список литературы

1. Kahles A., Lehmann K., Toussaint N.C., et al. Comprehensive Analysis of Alternative Splicing Across Tumors from 8,705 Patients // *Cancer Cell*. – 2018. – Vol. 34, № 2. – P. 211–224.
2. Raj T., Li Y.I., Wong G., et al. Integrative transcriptome analyses of the aging brain implicate altered splicing in Alzheimer's disease susceptibility // *Nature genetics*. – 2018. – Vol. 50, № 11. – P. 1584–1592.
3. Ruano C.S.M., Apicella C., Jacques S., et al. Alternative splicing in normal and pathological human placentas is correlated to genetic variants // *Human Genetics*. – 2021. – Vol. 140. – P. 827–848.
4. Zhang X., Chen M.H., Wu X., et al. Cell-Type-Specific Alternative Splicing Governs Cell Fate in the Developing Cerebral Cortex // *Cell*. – 2016. – Vol. 166, № 5. – P. 1147–1162 .e15.
5. Schatz F., Guzeloglu-Kayisli O., Arlier S., et al. The role of decidual cells in uterine hemostasis, menstruation, inflammation, adverse pregnancy outcomes and abnormal uterine bleeding // *Human reproduction update*. – 2016. – Vol. 4. – P. 497–515.
6. Бабовская А.А., Трифонова Е.А., Сереброва В.Н., и др. Протокол полнотранскриптомного анализа децидуальных клеток плаценты // *Молекулярная биология*. – 2022. – Т. 56, № 2. – С. 325–333.
7. Vaquero-Garcia J., Barrera A., Gazzara M.R., et al. A new view of transcriptome complexity and regulation through the lens of local splicing variations // *Elife*. – 2016. – Vol. 5. – A. e11752.
8. Monteuis G., Wong J.J.L., Bailey C.G., et al. The changing paradigm of intron retention: regulation, ramifications and recipes // *Nucleic acids research*. – 2019. – Vol. 47, № 22. – P. 11497–11513.
9. Yarden Y., Sliwkowski M.X. Untangling the ErbB signalling network // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2001. – Vol. 2, № 2. – P. 127–137.
10. Huang C.J., Wu D., Jiao X.F., et al. Maternal *SENP7* programs meiosis architecture and embryo survival in mouse // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*. – 2017. – Vol. 1864, № 7. – P. 1195–1206.
11. Jiang B., Zhao W., Yuan J., et al. Lack of *Cul4b*, an E3 ubiquitin ligase component, leads to embryonic lethality and abnormal placental development // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. A. e37070.
12. Liu H.C., Enikolopov G., Chen Y. *Cul4B* regulates neural progenitor cell growth // *BMC Neuroscience*. – 2012. – Vol. 13. – P. A. 112.

УДК: 616-006-036.17-091.818:576.3

Stages of lysosomal entosis in cancer tissue lung and colorectal cancer

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

Scientific Supervisor: N.V. Litvyakov

Tomsk National Research Medical Center, RI of Oncology, Russia, Tomsk, Kooperativny str. 5, 634009

E-mail: xenia.gaptulbarova@yandex.ru

Abstract. *To this day, one of the major obstacles in cancer treatment is tumour progression after chemotherapy and radiotherapy, the mechanisms of which are still being elucidated by the scientific community. Structures such as 'cell-in-cell' (CIC) have been observed in malignancy samples for over a century. Entosis itself is a process whereby living and viable cells are internalised into neighbouring cells of the same type, involving adhesion molecules, forming the very same CIC structures. There is evidence that chemotherapy may be one of the possible triggers for the initiation of entosis in tumour populations. We suggest that in the process, aneuploidy in host cells may arise, in particular, the appearance of stemness gene amplifications, dramatically affecting the risk of metastasis.*

Key words: *entosis, cell-in-cell, lysosomal entosis, lung cancer, colorectal cancer.*

Introduction

In 2007, Overholtzer M. et al. published a paper presenting a new process of non-apoptotic cell death in human tumours triggered by the loss of matrix adhesion [1]. The authors named this new process 'entosis'. The peculiarity of this type of cell death is that the inner cell itself actively penetrates into the host cell (internalised), the process occurs between homotypic cells with the involvement of adhesion molecules, forming the very cell-in-cell (CIC) structures. In the literature of the last 5 years we can find evidence that the presence of CICs in tumour material contributes to tumour progression. Indicating that entosis can be considered as a characteristic of malignant cells for practical diagnosis of pathology. Chemotherapy is thought to be able to trigger entotic events between tumour cells. We assume that under the action of chemopreparations, due to the mechanism of entosis and subsequent death of the internalised cell, fusion of the genetic material of the internalised and engulfing cells may occur. This provokes the occurrence of aneuploidy, in particular, the appearance of amplifications of stemness genes, dramatically affecting the risk of metastasis [2]. Also in 2017, in their work Garanina A.S. et al. proposed a variant of the sequence of stages of entosis in substrate-dependent tumour cultures. The authors identified 5 stages of lysosomal entosis in situ [3]. In the literature there are no studies demonstrating these stages directly on clinical material of cancer patients.

Research methods

This study included 40 patients with colorectal cancer (CRC) T1-4N0-2M0 (stages I-IIIB) and 30 patients with lung cancer (LC) T1-3N0-3M0 (stages IIA-IIIA) with morphologically verified diagnosis. The patients' study material was fixed, after which paraffin blocks for histological sections were made. Then standard haematoxylin-eosin staining was performed. Mackay's Criteria [4], which is recognised and used by many laboratories, was used for histological determination of entosis. Entotic indices are counted in haematoxylin/eosin (H&E) stained specimens where a minimum of four of the following six features can be unambiguously identified:

- 1) A clear nucleus of the internalised (infiltrated) cell;
- 2) Clearly defined cytoplasm of the internalised (infiltrated) cell;
- 3) The nucleus of the host cell is clearly defined;
- 4) The nucleus of the engulfing cell has a sickle/lunar shape;
- 5) Clearly defined cytoplasm of the engulfing cell;
- 6) The presence of an entotic vacuole between the lyser cell and the host cell.

The frequency of entosis was compared with the main clinical and morphological parameters of patients (stage, tumour size, degree of differentiation, Grade). Statistical processing of the data was carried out using application software packages 'Statistica 8' (StatSoft Inc., USA).

After that, one sample of each localisation was selected for visualisation on a 3D HISTECH PANNORAMIC MIDI histoscanner to visualise entotic events, the frequency of which was more than 0.3. Statistical processing of the data was performed using the application software packages 'Statistica 8' (StatSoft Inc., USA).

Results

Twenty randomly selected fields of histological specimen were taken for each glass and entotic structures were searched and counted using Mackay criteria (Fig. 1). The average frequency of occurrence for CRC patients was 0.25 and for RL patients 0.07.

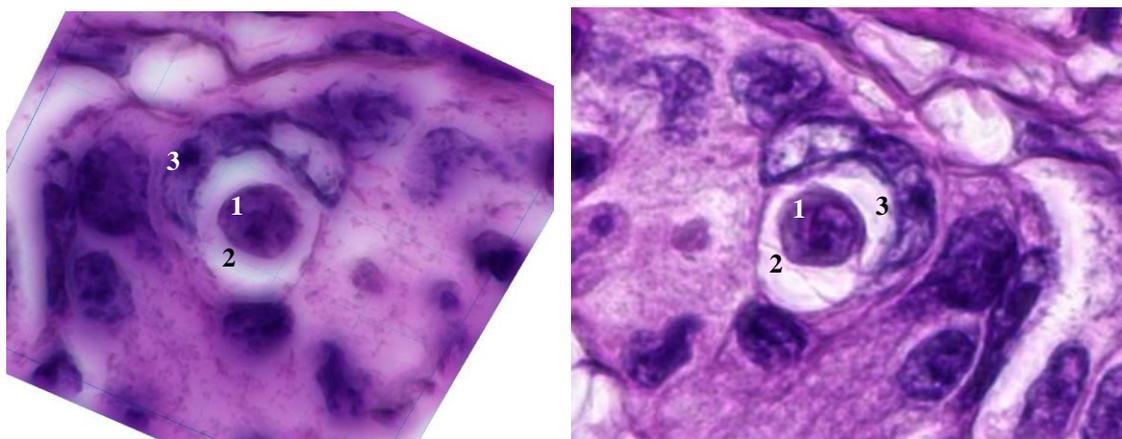


Fig. 1. Entosis images obtained with 3D HISTECH PANNORAMIC MIDI.
Note: 1. The nucleus of the inner cell; 2. Entotic vacuole; 3. The nucleus of the host cell

After that we considered the relationship of entotic event frequency with the main clinical and morphological parameters of patients: tumour size, stage, degree of differentiation, Grade. As a result of the analysis it was found that the frequency of entotic events was practically not related to clinical and morphological parameters. An association between the age of patients and the number of CIC ($p = 0.007$) for CRC, as well as an association between lymphogenic metastasis and the number of CIC ($p = 0.03$) for RL patients was shown (Fig. 2).

The prognostic significance of CIC structures was also assessed (Fig. 3). The overall survival of patients with colorectal cancer and the metastatic-free survival of patients with lung cancer were calculated. Patients with RL in whom no entosis was noted had a metastatic-free survival rate of almost 80 %, while this rate was 2-fold lower in patients with entosis ($p = 0.05$). In patients with CRC, overall survival in the group with no entotic events showed 100 % survival, compared to 80 % in the second group ($p = 0.078$). This indicates that the presence of entotic events in the clinical material may indicate a poor prognosis for the course of the disease.

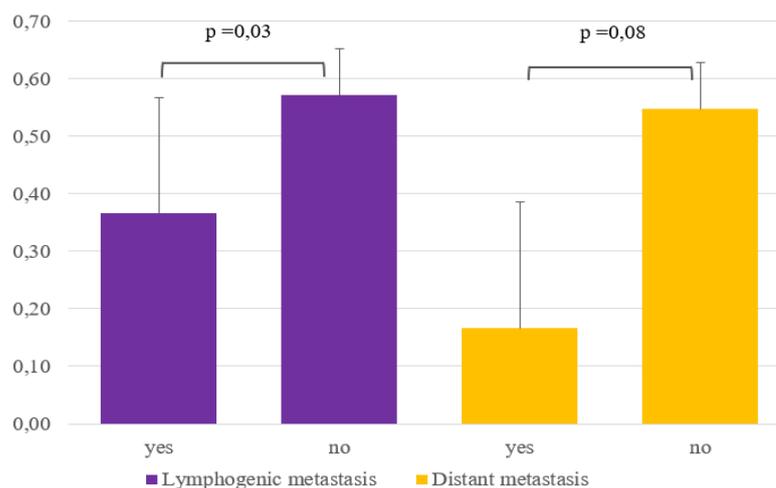


Fig. 2. Correlation of the frequency of cell-in-cell structures with lymphogenic and distant metastasis in lung cancer patients

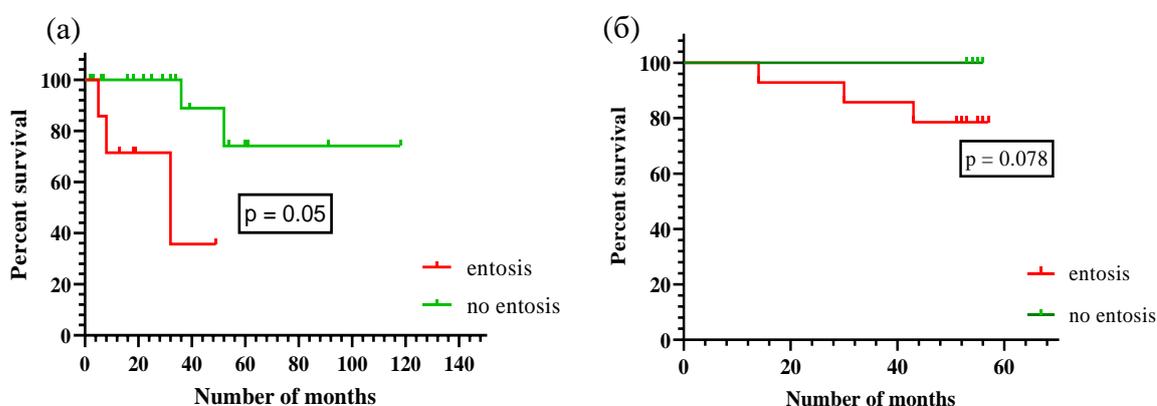


Fig. 3. Graph of metastatic-free survival of (a) lung cancer patients and Graph of overall survival of colorectal cancer patients (b)

To visualize the results, we selected one sample for each localisation with a CIC frequency of more than 0.3 in the clinical material. In the process, we were able to identify 5 consecutive stages of lysosomal entosis.

Conclusions

In connection with the results obtained, the study of entosis will be continued; it may provide a key to understanding the mechanism of rapid development of aneuploid subpopulations of tumour cells during chemotherapy and tumour progression. We have also managed to confirm the existence of the stages of entosis in cell cultures, which have been identified in the literature.

References

1. Overholtzer M. et al. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion // *Cell*. – 2007. – Vol. 131, № 5. – P. 966–979.
2. Gaptulbarova K. A. et al. Mechanisms and significance of entosis for tumour growth and progression // *Cell Death Discovery*. – 2024. – Vol. 10, № 1. – P. 109.
3. Garanina A. S. et al. Consecutive entosis stages in human substrate-dependent cultured cells // *Scientific reports*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 12555.
4. Mackay H.L. et al. Genomic instability in mutant p53 cancer cells upon entotic engulfment // *Nat Commun*. Springer US. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 1–15.

УДК 636.09

**Изучение представленности *Tritrichomonas foetus* в популяции крупного рогатого скота
Новосибирской области****И.Б. Грибченко^{1,2}, В.Д. Бец¹, К.Е. Евстропова¹**

Научный руководитель: доцент, д.в.н. Н.Н. Шкиль

Новосибирский государственный технический университет

Россия, г. Новосибирск, пр. К. Маркса, 20, 630073

Сибирский федеральный научный центр агrobiотехнологий РАН

Россия, р.п. Краснообск, ул. Центральная, 7, 630501

E-mail: inna.gri01@mail.ru

Study of *Tritrichomonas foetus* representation in cattle population of Novosibirsk region**I.B. Gribchenko^{1,2}, V.D. Bets¹, K.E. Evstropova¹**

Scientific Supervisor: Ass. Prof., Dr. N.N. Shkil

¹Novosibirsk State Technical University, Russia, Novosibirsk, K. Marksa str, 20, 630073²Siberian Federal Scientific Centre of Agrobiotechnologies, Russia, sett. Krasnobsk, Centralnaya str., 7, 630501

E-mail: inna.gri01@mail.ru

Abstract. Protozoal infection is an important factor in reducing the productivity of farm animals. The causative agent of protozoal infection causing abortion and infertility in cattle is most often protozoa – *Tritrichomonas foetus*. In order to determine the epizootic situation in the region, we studied the representation of pathogenic trichomonads in cattle of the Novosibirsk region. Using specific primers, we detected traces of *T. foetus* DNA in samples obtained from adult animals with clinical signs of endometritis and vaginitis from different farms. Also, vaginal mucus samples from these animals were examined by direct light microscopy, where active trophozoites of *T. foetus* were found, indicating the circulation of the parasitic protozoan in the cattle population of the Novosibirsk region.

Key words: protozoal infection, *Tritrichomonas foetus*, cattle.

Введение

Получение качественной и безопасной продукции возможно только при условии обеспечения здоровья сельскохозяйственных животных. Важным фактором, влияющим на изменения в состоянии животных, являются инфекции. Помимо бактериальных и вирусных, большой экономический ущерб животноводству наносят и протозойные инфекции [1].

Среди протозойных инфекций, одним из наиболее убыточных, с экономической точки зрения, является трихомониаз, вызываемый жгутиковыми простейшими *Tritrichomonas foetus*. У животных, поражённых данным паразитом, практически всегда снижаются надои, а также с большой вероятностью происходит аборт плода на 3-4 месяце стельности [2].

Механизм адгезии рассматривается уже давно и считается, что он одинаков для большинства известных *Tritrichomonas spp.* Активные трихомонады взаимодействуют с эпителиальными клетками путем адгезии с последующим энергетическим паразитизмом [3]. Экзосомальные везикулы паразитов содержат транспортные белки и нуклеиновые кислоты, которые участвуют в иммуномодуляции и вирулентности внутри хозяина [4].

Трихомонады имеют гликопротеиновые комплексы для коммуникации с клетками хозяина [5]. Такая коммуникация экзосомальных везикул с клетками эктоцервикса запускает секрецию провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 (IL-6) и интерлейкина-8 (IL-8) [6, 7]. Такие механизмы могут способствовать усиленному росту паразита и развитию патологии, не вызывая сильного раннего иммунного ответа [5]. За счёт этого диагностика на ранних стадиях затруднена ввиду отсутствия клинической симптоматики. Поэтому животные долгое время могут оставаться бессимптомными носителями.

Диагностика трихомониаза осуществляется посредством ПЦР диагностики, однако на данный момент единственным действенным протоколом лечения является применение препаратов метронидазольного ряда [8]. Применение данных препаратов длительное время приводит к проявлению серьезных побочных эффектов. Поэтому продолжение поиска эффективных и безопасных препаратов является важной задачей.

Экспериментальная часть

Данные о физиологических показателях, а также образцы проб для проведения исследования были получены в хозяйствах Новосибирской области от крупного рогатого скота чёрно-пёстрой голштинизированной породы. Отбор проб производился от абортировавших на ранних сроках коров, а также от коров с признаками эндометрита. Образцы были получены от 52 животных.

Для оценки физиологических показателей проводилась термометрия при помощи электронного термометра (VitaVet PRO, Китай). Так же проводилось измерение количества дыхательных циклов в минуту на основе подсчёта движения грудной клетки. Частоту пульса определяли пальпацией на хвостовой артерии. Перечисленные выше исследования проводилось до отбора проб, в спокойном состоянии.

Отбор проб производился путём смыва со слизистой оболочки влагалища при помощи сваба (Aptaca S.P.A., Италия), далее сваб помещался в стерильную пробирку типа Эппендорф 1,5 мл (Sovtech, Россия) и транспортировался с хладагентами (+ 4 °С) в лабораторию для последующего выделения ДНК.

Для выделения ДНК из свабов использовалась система DU-250 (Биолабмикс, Россия). Концентрацию и чистоту выделенной ДНК, определяли с помощью системы EzDrop 1000C (Blue-Ray Biotech, Тайвань). Для постановки ПЦР использовали праймеры для *Tritrichomonas*. Все праймерные последовательности подбирали при помощи программ Primer BLAST. ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе ДТлайт 4S1 Real Time PCR (ДНК-технологии, Россия). Аликвоты продуктов ПЦР-амплификации разделяли на 1,5%-м агарозном геле. Использовали набор маркеров O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas L.S., США). Изображения агарозного геля были визуализированы с помощью гель-документирующей системы Clinex (Clinex Science Instruments Co., Китай).

Для микроскопии образцы с влагалищными смывами разводили в охлажденном до + 4 °С растворе Хэнкса (HBSS, Gibco, США) и каплю помещали на предметное стекло. Помимо этого, проводили окрашивание ядер и цитоплазмы паразитических простейших с помощью флуоресцентного красителя Hoechst 33342 (Thermo FS, США). Исследование образцов проводили на прямом световом микроскопе Olympus CX43 с блоком флуоресценции (Olympus Corp., Япония).

Результаты

В результате исследования были получены данные от 52 коров в возрасте от 2 до 4 лет, с клиническими признаками эндометрита и после абортов. По результатам измерений физиологических показателей, нами были получены данные, анализ которых показал, что частота пульса и частота дыхательных движений у животных с положительными и отрицательными ПЦР достоверных различий не имели и находились в пределах физиологической нормы. Однако температура тела у двух групп животных достоверно различалась и была выше у положительно среагировавших животных, однако находилась в пределах физиологической нормы. Это может говорить о наличии небольшого воспалительного процесса в организме.

В результате исследования влагалищных смывов от исследуемых животных, было обнаружено 14 из 52 образцов с положительным результатом, что составляет 26,9 %.

При микроскопии образцов влагиаличных смывов были обнаружены трофозонты *T. foetus*. Их присутствие в образцах может свидетельствовать о контаминации слизистой оболочки влагиалища.

Заключение

Распространение протозойных инфекций связано с поздней диагностикой и низкой эффективностью применяемого терапевтического лечения. Данный вид инфекций недооценён с точки зрения распространённости и объёма экономического ущерба. Постоянный мониторинг заболеваемости и поиск новых эффективных и безопасных препаратов позволит снизить экономические потери в животноводстве.

Список литературы

1. Hassan-Kadle A.A., Ibrahim A.M., Nyingilili H.S., Yusuf A.A., Vieira R.F.C. Parasitological and molecular detection of *Trypanosoma* spp. in cattle, goats and sheep in Somalia // *Parasitology*. – 2020. – Vol. 147. – P. 1786–1791. – doi:10.1017/S003118202000178X.
2. Collántes-Fernández E., Fort M.C., Ortega-Mora L.M., Schares G. *Trichomonas* // *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*. – 2018. – P. 313–388. – doi:10.1007/978-3-319-70132-5_14.
3. Mercer F., Johnson P.J. *Trichomonas vaginalis*: Pathogenesis, Symbiont Interactions, and Host Cell Immune Responses // *Trends Parasitol.* – 2018. – Vol. 34. – P. 683–693. – doi:10.1016/j.pt.2018.05.006.
4. Rada P., Hrdý I., Zdrha A., Narayanasamy R.K., Smutná T., Horáčková J., Harant K., Beneš V., Ong S.C., Tsai C.Y., et al. Double-Stranded RNA Viruses Are Released From *Trichomonas vaginalis* Inside Small Extracellular Vesicles and Modulate the Exosomal Cargo // *Front Microbiol.* – 2022. – Vol. 13. – doi:10.3389/fmicb.2022.893692.
5. Twu O., de Miguel N., Lustig G., Stevens G.C., Vashisht A.A., Wohlschlegel J.A., Johnson P.J. *Trichomonas vaginalis* Exosomes Deliver Cargo to Host Cells and Mediate Host:Parasite Interactions // *PLoS Pathog.* – 2013. – Vol. 9. – doi: 10.1371/journal.ppat.1003482.
6. Chudnovskiy A., Mortha A., Kana V., Kennard A., Ramirez J.D., Rahman A., Remark R., Mogno I., Ng R., Gnjjatic S., et al. Host-Protozoan Interactions Protect from Mucosal Infections through Activation of the Inflammasome // *Cell*. – 2016. – Vol. 167. – P. 444-456.e14. – doi:10.1016/j.cell.2016.08.076.
7. Szempruch A.J., Dennison L., Kieft R., Harrington J.M., Hajduk S.L. Sending a message: Extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites // *Nat Rev Microbiol.* – 2016. – Vol. 14. – P. 669–675. – doi:10.1038/nrmicro.2016.110.
8. Love D., Fajt V.R., Hairgrove T., Jones M., Thompson J.A. Metronidazole for the treatment of *Tritrichomonas foetus* in bulls // *BMC Vet Res.* – 2017. – Vol. 13. – doi:10.1186/s12917-017-0999-2.

УДК 616.24-006.6-092.9:577.2

**Изучение метастатической способности карциномы легкого Льюиса под действием
низкомолекулярных ингибиторов генов стволовости**

Д.С. Долгашева^{1,2}, И.А. Цыденова^{1,2}, А.К. Шагабудинова^{1,3}

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

¹Томский национальный исследовательский медицинский центр, НИИ онкологии,
Россия, г. Томск, пер. Кооперативный 5, 634050

²Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

³Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050

E-mail: normikus.18.97@gmail.com

**Study of the metastatic ability of Lewis lung carcinoma under the influence of low molecular
weight inhibitors of stemness genes**

D.S. Dolgasheva^{1,2}, I.A. Tsydenova^{1,2}, A.K. Shagabudinova^{1,3}

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

¹Tomsk National Research Medical Center, RI of Oncology, Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634050

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

³Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow Trakt str., 2, 634050

E-mail: normikus.18.97@gmail.com

Abstract. Unlike primary tumors, metastasis is a systemic disease and requires more complex therapeutic strategies. Despite its importance, to date the mechanisms of metastasis are still not fully understood. In the present study, we investigated the effects of small-molecule inhibitors of stemness genes (*TERT*, *MYC* and *NOTCH1*) on the metastatic potential of Lewis lung carcinoma (LLC). All inhibitors were shown to significantly reduce the number and area of lung metastases as well as the incidence of metastasis. The greatest efficacy was seen with the combined use of inhibitors, which resulted in a reduction in metastasis rate of up to 20 % (compared to 100 % in the control group). The metastasis inhibition index was 98 % for the combination of inhibitors, confirming the key role of stemness genes in the development of metastasis. These findings emphasize the potential of targeted therapy aimed at suppressing stemness gene activity to inhibit the metastatic process.

Key words: Lewis lung carcinoma, metastasis, stemness genes, dedifferentiation.

Введение

Метастазирование представляет собой сложный многоступенчатый процесс, приводящий к образованию вторичных очагов опухолевого роста в результате распространения злокачественных клеток из первичного очага. Около 90 % смертей онкологических больных вызваны развитием метастазов [1]. В отличие от первичных опухолей, метастазирование является системным заболеванием и требует более сложных терапевтических стратегий. Несмотря на свою значимость, механизмы метастазирования по-прежнему изучены не до конца. Одним из важных аспектов процесса метастазирования является роль генов стволовости, которые регулируют пролиферацию, выживаемость и метастатический потенциал опухолевых клеток [2, 3].

В последние годы низкомолекулярные ингибиторы генов стволовости привлекают внимание как потенциальные агенты для подавления метастатического процесса [4]. Однако их влияние на метастатическую способность опухолевых клеток *in vivo* остается недостаточно изученным. Таким образом, целью настоящей работы явилась оценка влияния низкомолекулярных ингибиторов генов стволовости на метастатический потенциал карциномы легкого Льюиса.

Экспериментальная часть

В исследование было включено 40 имбредных мышей самок линии C57Bl/6 (возраст 7–8 недель) первой категории, разводки отдела экспериментального биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ. Эвтаназию животных проводили в CO₂ камере. В работе были использованы низкомолекулярные ингибиторы генов стволовости *TERT* (BIBR1532), *MYC* (10058-F4) и *NOTCH1* (FLI-06). Опухолевые клетки LLC получали при внутрибрюшинной инфузии средой RPMI-1640 мышей с трансплантированной внутрибрюшинно LLC за неделю до проведения эксперимента. Далее, после отмывки, клетки LLC помещали в полную питательную среду RPMI-1640. Было сформировано пять групп: к клеткам контрольной группы добавляли 1 % DMSO (Sigma, США), в каждую из трех экспериментальных групп добавляли ингибиторы BIBR1532 (Sigma, США), 10058-F4 (Sigma, США) и FLI-06 (Sigma, США) растворенные в DMSO, в концентрациях, эквивалентных их IC₅₀ (BIBR1532 – 93 нМ, 10058-F4 – 64 мкМ, FLI-6 – 5 мкМ), последняя группа включала клетки, обработанные комбинацией из трех ингибиторов. Затем клетки LLC инкубировали 24 часа в CO₂-инкубаторе при температуре 37 градусов. Через 24 часа клетки трижды отмывали от DMSO и ингибиторов, подсчитывали количество и оценивали их жизнеспособность. На следующем этапе животным внутривенно вводили по 500 тысяч жизнеспособных клеток LLC, инкубированных с ингибиторами и формировали следующие группы по 10 мышей: контроль, FLI-06, BIBR1532, 10058-F4 и All Inhibitors (комбинация ингибиторов). Далее на 6 сутки после трансплантации опухоли мышей умерщвляли и оценивали количество метастазов в легких и площадь метастазов. На основании данных показателей вычисляли индекс ингибирования метастазирования по формуле:

$$MII = \frac{A_{con}B_{con} - A_{exp}B_{exp}}{A_{con}B_{con}},$$

где A_{con} – процент мышей с метастазами в контрольной группе, A_{exp} – процент мышей с метастазами в экспериментальной группе, B_{con} – количество метастатических колоний в легких мышей из контрольной группы, B_{exp} – количество метастатических колоний в легких мышей из экспериментальной группы.

Индекс торможения роста метастазов рассчитывался по следующей формуле:

$$IGM = \frac{S_{con} - S_{exp}}{S_{con}},$$

где S_{con} – средняя площадь метастатических колоний в контрольной группе мышей, S_{exp} – средняя площадь метастатических колоний в экспериментальной группе.

Результаты

Исследование показало, что низкомолекулярные ингибиторы генов стволовости существенно снижают количество и среднюю площадь метастазов, а также частоту метастазирования. Наилучшие результаты были получены при одновременном использовании всех трех ингибиторов. Для группы, в которой клетки были обработаны комбинацией ингибиторов показано существенное снижение частоты метастазирования, она составила 20 %. Частота метастазирования в контрольной группе составила 100 %, в группе, которой вводили клетки с ингибитором FLI-06 (ген *NOTCH1*) данный показатель составил 60 %, а в группах с 10058-F4 (ген *MYC*) и BIBR-1532 (ген *TERT*) – 30 % (рис. 1).

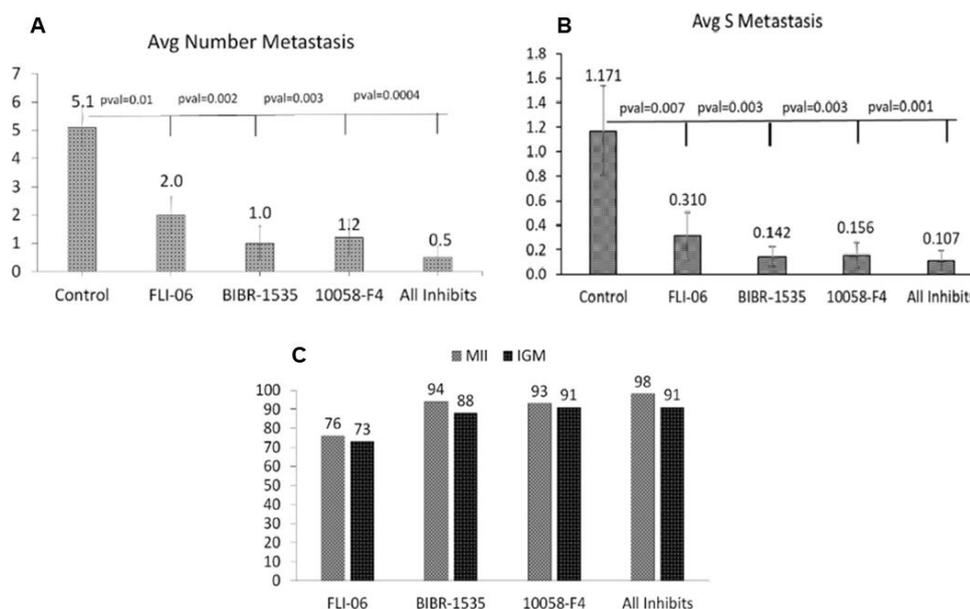


Рис. 1. Антиметастатическое действие низкомолекулярных ингибиторов генов стволовости
Примечание: А – Среднее количество метастазов в группах, В – Средняя площадь метастазов в группах;
С – Индекс ингибиции метастазирования и индекс торможения роста метастазов

Индекс ингибиции метастазирования для групп, в которых использовались клетки, обработанные одним ингибитором, составил 76 %, 94 % и 93 % для FLI-06, BIBR-1532 и 10058-F4 соответственно. Для комбинации ингибиторов данный показатель составил 98 %. Индекс торможения роста метастазов для группы с ингибитором FLI-06 составил 73 %, для группы с BIBR-1532 – 88 %, для группы 10058-F4 и комбинации ингибиторов – 91 %.

Полученные результаты показали, что ингибиторы генов стволовости эффективно предотвращают развитие метастазов в легких и тормозят их рост.

Заключение

Проведенное исследование продемонстрировало, что низкомолекулярные ингибиторы генов стволовости существенно снижают метастатический потенциал карциномы легкого Льюиса (LLC). Наибольшая эффективность была достигнута при комбинированном применении ингибиторов, что привело к снижению частоты метастазирования до 20 % (по сравнению с 100 % в контрольной группе) и увеличению индекса ингибирования метастазирования до 98 %. Индивидуальное применение ингибиторов также показало значительное снижение количества и площади метастазов, что подтверждает ключевую роль генов стволовости в процессе метастазирования.

Список литературы

1. Dillekas H., Rogers M.S., Straume O. Are 90 % of deaths from cancer caused by metastases? // Cancer medicine. – 2019. – Vol. 8, № 12. – P. 5574–5576.
2. Beck B., Blanpain C., Unravelling cancer stem cell potential. // Nature Reviews Cancer. – 2013. – Vol. 13, № 10. – P. 727–738.
3. Takebe N., Miele L., Harris, P.J., et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. // Nature Reviews Clinical Oncology. – 2015. – Vol. 12, № 8. – P. 445–464.
4. Wang Z., Li Y., Ahmad A., et al. Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer. – 2010. – Vol. 1806, № 2. – P. 258–267.

УДК: 616.345-006.6-033.2:611.36:615.28:577.21

Молекулярные маркеры опухоли толстой кишки и метастаза в печени у пациента с полным ответом на предоперационное лечение**Д.А. Еремин, Т.А. Дронова, Д.Н. Костромицкий**

Научный руководитель: д.м.н. Н.Н. Бабышкина

Томский национальный исследовательский медицинский центр, НИИ онкологии

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

E-mail: nbabyskhina@mail.ru**Molecular markers of a colon tumor and liver metastasis in a patient with a complete response to preoperative treatment****D.A. Eremin, T.A. Dronova, D.N. Kostromitsky**

Scientific Supervisor: Dr. N.N. Babyskhina

Tomsk National Research Medical Center, RI of Oncology, Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634009

E-mail: nbabyskhina@mail.ru

Abstract. *The identification of new molecular markers in colon cancer (CRC) represents a significant advancement in cancer diagnostics and personalized treatment approaches. Despite the fact FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) regimen of chemotherapy significantly improves the survival of patients with metastatic colon cancer, it ranks 5th in the structure of cancer mortality from malignant tumors. We present potential transcriptomic and proteomic markers of response to neoadjuvant FOLFOXIRI such as ZG16 and EPS8L2.*

Key words: *Colon cancer, liver metastasis, FOLFOXIRI, sequencing, molecular markers.*

Введение

Метастатический рак толстой кишки (мРТК) занимает лидирующее место в структуре онкологической заболеваемости и смертности, как среди мужского, так и женского населения. Современные возможности химиотерапии в сочетании с таргетной терапией позволяют улучшить показатели выживаемости по сравнению с оптимальной поддерживающей терапией, однако, молекулярные маркеры эффективности применяемых схем лечения мРТК в настоящее время не определены [1, 2].

Цель исследования, определение молекулярных маркеров чувствительности первичной опухоли толстой кишки и метастатических узлов в печени после применения неoadъювантной химиотерапии FOLFOXIRI (фторпиримидин, иринотекан, оксалиплатин и лейковорин) в комбинации с цетуксимабом.

Экспериментальная часть

В исследовании использован биопсийный и операционный материал четырех пациентов мРТК (T4N1M1), включающий парные образцы опухолевой ткани толстой кишки, прилежащей нормальной ткани толстой кишки, образцы метастазов в печень и прилежащей нормальной ткани печени до и после неoadъювантного применения FOLFOXIRI в комбинации с цетуксимабом. Согласно критериям, RECIST 1.1. объективный ответ первичной опухоли толстой кишки, оцененный как частичная регрессия отмечен у всех пациентов; частичная регрессия метастазов в печени наблюдалась у трех пациентов, полная регрессия метастазов в печени – у одного пациента.

Из исследуемых образцов РНК выделена с помощью коммерческих наборов (PureLink RNA Mini Kit, RNA PureLinK FFPE). Целостность РНК оценена с помощью гелелектрофореза на 4150 Tape Station (Agilent, США). Оценка концентрации и качества РНК определена спектрофотометрически на приборе NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Подготовка РНК-библиотек осуществлена с помощью набора (KAPA RNA HyperPrep

Kit with RiboErase (HMR)). Оценка их качества проведена электрофоретически с помощью 4150 Tape Station (Agilent, США), концентрация библиотек – с использованием флюориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific). Пулированные библиотеки подвергнуты массовому параллельному секвенированию на приборе NextSeq500 (Illumina, США). Качество секвенирования оценено с помощью программных пакетов FastQC и MultiQC. Выравнивание прочтений на референсный геном проведено с помощью программы STAR, в качестве референса использована геномная сборка GRCh38 и аннотации GENCODE.R42. Подсчет прочтений, картированных на индивидуальные гены, проведен при помощи программы HTSeq-count. Данные о дифференциальной экспрессии генов между исследуемыми группами получены при помощи программного пакета DESeq2 в среде R.

Исследуемые образцы использованы для получения гомогенатов опухолевой ткани и метастазов в печень с помощью автоматической системы для дезагрегации тканей Medimachine («Dako», США). Оценка уровня экспрессии белков первичной опухоли толстой кишки и метастазов в печень проведена на цитофлуориметре CytoFLEX («Beckman Coulter», США).

Результаты

В результате анализа полнотранскриптомного секвенирования образцов пациента с полной регрессией метастазов в печени до неoadьювантного применения FOLFOXIRI в комбинации с цетуксимабом в первичной опухоли толстой кишки обнаружена гиперэкспрессия гена *ZG16* (рис. 1).

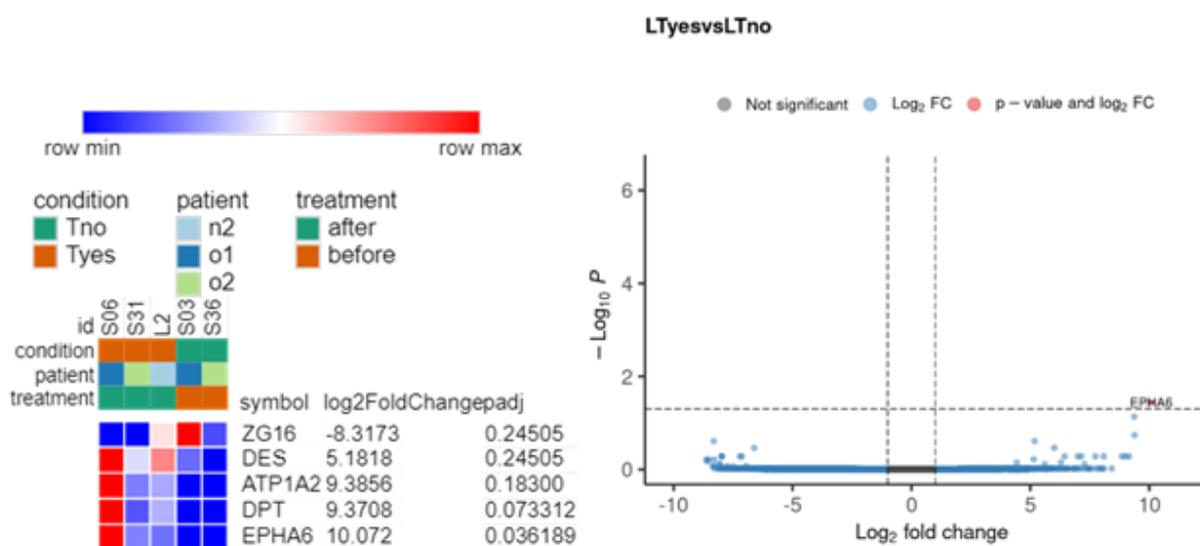


Рис. 1. Дифференциально экспрессируемые гены в опухолевой ткани толстой кишки до и после неoadьювантной химиотерапии FOLFOXIRI в комбинации с цетуксимабом

Последующий анализ транскриптома образцов метастазов в печени данного пациента выявил гиперэкспрессированный транскрипт *EPS8L2* до неoadьювантного применения FOLFOXIRI в комбинации с цетуксимабом. Тогда как у пациентов с частичной регрессией метастатических очагов обнаружен более широкий спектр гиперэкспрессированных генов *EPS8L3*, *SCNN1A*, *ATP10B*, *MYO7B*, *ANO9*, *MUC4*, *CDH17*, *NXPE1*, *EVPL*, *EPPK1*, *SLC44A4*, *SPIRE2*, *PKP3*, *CDCA7*, *MYO1A*, *VIL1*, *BNIP5*, *MUC12*, *KLF5* (рис. 2).

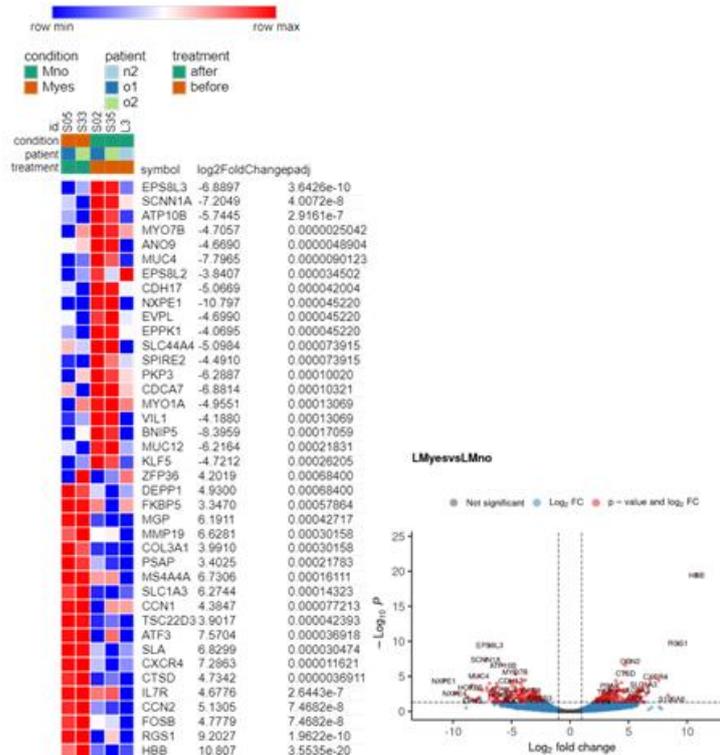


Рис. 2. Дифференциально экспрессируемые гены в метастазах в печень до и после неoadьювантной химиотерапии FOLFOXIRI в комбинации с цетуксимабом

Для изучения функционального потенциала выявленных нарушений транскрипционной активности генов, проведена оценка экспрессии соответствующих им белков. Анализ данных образцов пациента с полным ответом метастазов в печени показал, что процент клеток, экспрессирующих ZG16 в первичной опухоли больше, чем в метастатических узлах в печени (94,2 % против 1,86 %). Количество клеток, экспрессирующих EPS8L2 в метастазах в печени, значительно превышало их число в первичной опухоли толстой кишки у данного пациента (46,15 % против 9,40 %).

Таким образом, эффективный ответ первичной опухоли и метастазов в печени на FOLFOXIRI в комбинации с цетуксимабом ассоциирован с гиперэкспрессией ZG16 в первичной опухоли кишки и EPS8L2 в метастазах в печени, определяющей высокий уровень экспрессии соответствующих белков до начала предоперационного лечения. Обнаруженные транскрипты и кодируемые ими белки при дальнейшем исследовании могут быть использованы как потенциальные маркеры чувствительности первичной опухоли толстой кишки и метастатического поражения печени к FOLFOXIRI в комбинации с цетуксимабом.

Заключение

Гиперэксперсия ZG16 в первичной опухоли толстой кишки и EPS8L2 в метастатическом узле печени являются потенциальными маркерами чувствительности к неoadьювантной терапии FOLFOXIRI в комбинации с цетуксимабом.

Список литературы

1. Zhou H., Liu Z., Wang Y. et al. Colorectal liver metastasis: molecular mechanism and interventional therapy // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2022. – Vol. 7, № 70. – P. 1–20.
2. Ruivo A., Oliveira R.C., Silva-Vaz P., Tralhão J.G. Colorectal Cancer Liver Metastasis – State-of-the-Art and Future Perspectives // Gastrointestinal Disorders. – 2023. – Vol. 5, № 4. – P. 580–608.

УДК 618.14-006

**Влияние иммунотаргетной терапии на уровень цитокинов в сыворотке крови
у пациенток с раком эндометрия**

Н.А. Ермак, А.А. Мальцева, Е.И. Ливанос

Научный руководитель: д.м.н. М.Н. Стахеева

Томский национальный исследовательский центр, НИИ онкологии

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

E-mail: ermaknaonco@gmail.com

**Influence of immune targeted therapy on serum cytokine levels
in patients with endometrial cancer**

N.A. Ermak, A.A. Maltseva, E.I. Livanos

Scientific Supervisor: Dr. M.N. Stakheeva

Tomsk National Research Medical Center, RI of Oncology, Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634050

E-mail: ermaknaonco@gmail.com

Abstract. *Immune targeted therapy (ITT), including the Immune checkpoint inhibitor pembrolizumab and the targeting drug lenvatinib, which blocks tyrosine kinases of receptors, is one of the main treatment strategies for advanced endometrial cancer EC with proficient mismatch repair (pMMR) and microsatellite stable (MSS). In this study, we investigated the changes in serum cytokine levels associated with molecular cellular mechanisms of action of pembrolizumab and lenvatinib in endometrial cancer patients on immune targeted therapy for disease progression in relation to the efficacy of this treatment.*

Key words: *endometrial cancer, immune targeted therapy, antitumor treatment efficacy.*

Введение

Рак эндометрия (РЭ) является одной из значимых проблем здравоохранения во всем мире.

Иммунотаргетная терапия (ИТТ), включающая ингибитор контрольных точек иммунного ответа пембролизумаб и таргетный препарат ленватиниб, блокирующий тирозинкиназы рецепторов, является одной из основных стратегий лечения прогрессирующего рака эндометрия (пРЭ) с профицитом системы репарации (pMMR) и отсутствием микросателлитной нестабильности (MSS) [1]. Поскольку иммунологические механизмы вовлечены в реализацию терапевтических эффектов пембролизумаба и ленватиниба, то вероятно, что актуальное состояние иммунной системы пациенток оказывает влияние на эффективность ИТТ. В свою очередь, состояние иммунной системы модулируется цитокинами в сыворотке крови, уровень которых связан с системной опухолевой болезнью [2]. Целью данного исследования явилось изучение уровня сывороточных цитокинов (IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF, IFN- γ , MCP-1), у больных с прогрессирующим раком эндометрия при проведении иммунотаргетной терапии и его связь с эффективностью данного вида лечения.

Экспериментальная часть

В исследование вошли 10 пациенток с пРЭ I-IV (T1-4N0-2M0-1) стадии, с pMMR и MSS, получившие иммунотаргетную терапию, представляющую собой комбинацию анти-PD-1 моноклонального антитела пембролизумаба (БИОКАД, Россия) и мультикиназного ингибитора ленватиниба (EISAI, Япония). Терапию проводили по схеме: пембролизумаб 200 мг внутривенно 1 раз в 3 недели + ленватиниб 20 мг перорально 1 раз в сутки (21-дневные циклы).

Эффективность ИТТ оценивали методами лучевой диагностики на основании отсутствия признаков прогрессирования по шкале iRECIST. ИТТ считали эффективной, если у пациентки при проведении лечения в течение 6 месяцев и более не отмечены признаки прогрессирования заболевания. Если прогрессирование отмечено в течение 6 месяцев ИТТ, то терапию

признавали неэффективной. В зависимости от эффективности ИТТ сформированы 2 группы: с прогрессированием ИТТ в течение 6 месяцев от начала данной терапии ($n = 4$) и без признаков прогрессирования более 6 месяцев ($n = 6$). До начала ИТТ, через 2 месяца, 6 месяцев и спустя более чем 30 курсов терапии у пациенток методом иммуноферментного анализа оценивали следующие показатели в сыворотке крови: IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF, IFN- γ , MCP-1. В качестве контрольной группы выступили 20 пациенток с впервые диагностированным РЭ до начала противоопухолевого лечения. Было проведено попарное сравнение исследуемых показателей с использованием критерия Манна-Уитни.

Результаты

Прежде всего, следует отметить влияние прогрессирования и проведенного по этому поводу противоопухолевого лечения: в сравнении с пациентками с впервые установленным РЭ у больных, которым назначена ИТТ, отмечен более высокий уровень IL-10, (рис. 1, А), обладающего выраженным иммуносупрессивным эффектом. Проведение ИТТ в течение первых 6 месяцев не вызывало к выраженному изменению содержания исследуемых цитокинов в сыворотке крови у больных прогрессирующим РЭ. Однако более длительное применение пембролизумаба в комбинации с леватинибом сопровождалось значительным снижением уровня как провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8 (рис.1, В и С), так цитокина с противовоспалительной активностью IL-10 (рис. 1, А).

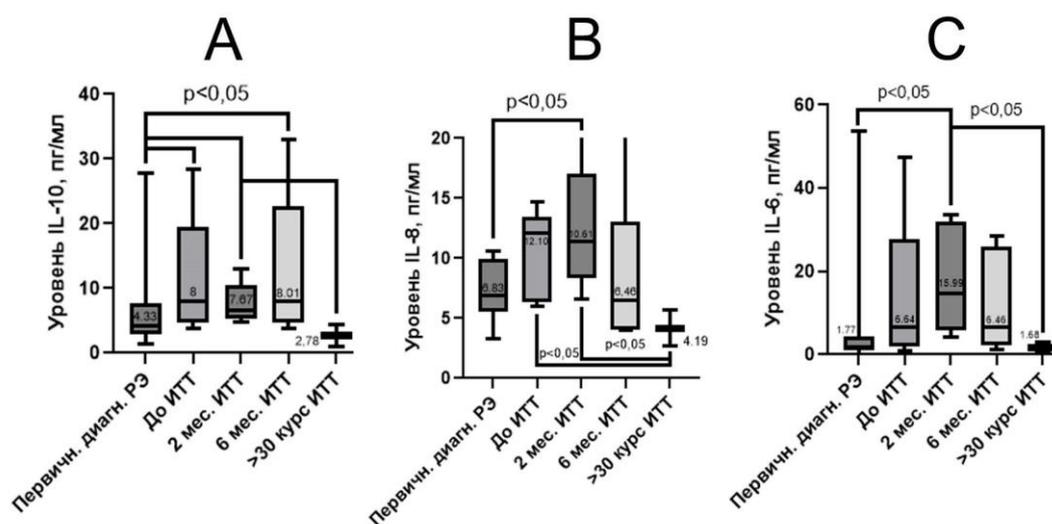


Рис. 1. Изменение уровня цитокинов в динамике проводимой ИТТ

Длительное применение ИТТ ассоциировано с терапевтическим ответом на данный вид лечения и, следовательно, угнетением опухолевого роста. Вероятно, отмеченное снижение содержания цитокинов в циркуляции на фоне длительного применения ИТТ свидетельствует об отмене регуляторного системного влияния опухоли на организм пациентки. Изменение концентраций ряда цитокинов в сыворотке крови у больных прогрессирующим РЭ была ассоциирована с эффективностью ИТТ. Так, уровень провоспалительного цитокина IL-8 снижался у пациенток с эффективной ИТТ, в то время как у больных с прогрессированием на фоне применения пембролизумаба в комбинации с леватинибом в течение 6 мес данный показатель оставался на том же уровне, что и до начала ИТТ (рис. 2, А). Данный факт, вероятно, указывает на снижение воспаления, индуцированного опухолью, при эффективном лечении.

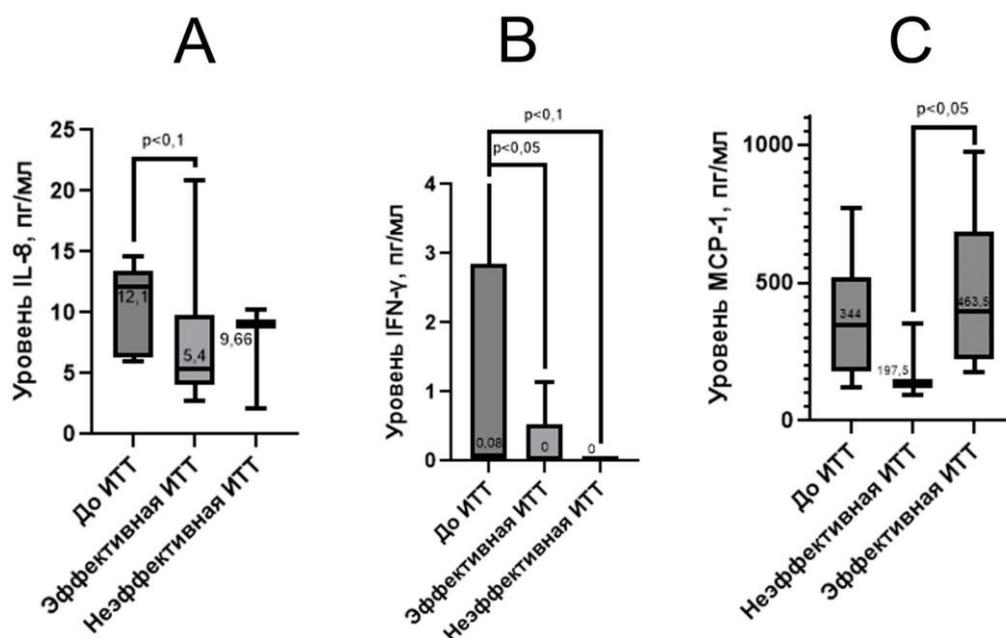


Рис. 2. Изменение уровня цитокинов в зависимости от эффективности проводимой ИТТ

Эффективная ИТТ у больных прогрессирующим РЭ приводила к увеличению в 2 раза содержания MCP-1 в сравнении с соответствующим показателем при неэффективной терапии (рис. 2, С). Известно, что MCP-1 – основной хемоаттрактант клеток моноцитарно-макрофагального ряда и определяет их миграцию в ткани, в том числе и опухоль. Связь более высокого уровня с эффективной ИТТ, по-видимому, свидетельствует о привлечении в опухоль моноцитов и макрофагов, обладающих цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток. Кроме того, вне зависимости от эффективности ИТТ отмечено снижение содержания IFN-γ в точке оценки исхода по сравнению с уровнем до начала ИТТ (рис. 2, В), что также указывает на снижение системного воспаления при применении пембролизумаба и лenvатиниба.

Заключение

У пациенток с прогрессирующим РЭ в сыворотке крови увеличено содержание иммуносупрессирующего цитокина IL-10 в сравнении с больными с впервые диагностированным РЭ. Влияние ИТТ на уровень цитокинов проявляется при ее длительном применении (> 30 курсов). Динамика изменения уровня цитокинов в циркуляции у больных РЭ связана с эффективностью терапии пембролизумабом в комбинации с лenvатинибом. При этом у пациенток с эффективной терапией отмечено снижение содержания провоспалительного цитокина IL-8 в сравнении с исходными показателями и более высокий уровень хемоаттрактанта MCP-1 относительно пациенток с неэффективным лечением, что может быть в перспективе использовано для мониторинга ответа на ИТТ

Список литературы

1. Makker, V., Colombo, N., Herráez, et.al. Lenvatinib Plus Pembrolizumab in Previously Treated Advanced Endometrial Cancer: Updated Efficacy and Safety From the Randomized Phase III Study 309/KEYNOTE-775 // Journal of Clinical Oncology. – 2023.
2. Morris RM, Mortimer TO, O'Neill KL. Cytokines: Can Cancer Get the Message? // Cancers (Basel). – 2022.

УДК 57.083:621.3.08

Детекция гликопротеина E вируса Западного Нила с помощью биосенсораА.Н. Ерёмкина^{1,2}, Д.В. Шаньшин¹, А.А. Черемискина¹Научный руководитель: д.т.н. В.М. Генералов¹¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
Россия, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, 630559²Новосибирский государственный педагогический университет, Россия, г. Новосибирск, ул.
Виллюйская, 28, 630126
E-mail: lina.eryomina2016@mail.ru**Detection of West Nile virus glycoprotein E using a biosensor**A.N. Eremina^{1,2}, D.V. Shanshin, A.A. Cheremiskina

Scientific Supervisor: Dr. V.M. Generalov

¹State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Russia, Novosibirsk
Region, sett. Koltsovo, 630559²Novosibirsk State Pedagogical University, Russia, Novosibirsk, Vilyuyskaya Str., 28, 630126
E-mail: lina.eryomina2016@mail.ru

Abstract. West Nile virus is an arbovirus in the family Flaviviridae, genus Flavivirus, that is transmitted to humans through the bites of infected mosquitoes. The virus can cause an infectious disease in humans that has a wide range of manifestations, from an asymptomatic course and mild fever to severe neurologic complications such as meningitis or encephalitis. Laboratory diagnosis of West Nile virus is made by detection of viral glycoprotein E. This work proposes a method for the rapid detection of glycoprotein E using a biosensor-based analytical device. The biosensor is based on a field-effect transistor fabricated using silicon-on-insulator technology. Protein detection using the biosensor is based on measuring the current amplitude in the source-drain circuit of the field-effect transistor with monoclonal antibodies immobilized on the surface in response to the appearance of the antigen – protein E of West Nile virus – in the analyzed sample. It was experimentally established that the biosensor is able to detect recombinant glycoprotein E of the West Nile virus at a concentration of 10 ng/ μ L.

Key words: biosensor, detection, West Nile virus, field-effect transistor, surface modification, infectious diseases, glycoprotein E.

Введение

Вирус Западного Нила (ВЗН) – РНК-содержащий вирус рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. По данным Центров по контролю и профилактике заболеваний около 80 % инфицированных ВЗН людей переносят заболевание бессимптомно. У 20 % развивается лихорадка, связанная с головной болью, болями в теле и в суставах, рвотой, диареей или сыпью. В 1 % случаев инфекция приводит к тяжелому заболеванию, поражающему центральную нервную систему, такому как энцефалит и менингит [1]. В России на конец августа 2024 года показатель заболеваемости составил 0,08 на 100 тыс. населения, что выше среднемноголетнего показателя на 13 % [2].

Капсид ВЗН включает в себя структурный белок (С) и липопротеиновую оболочку, в которую интегрированы мембранный белок (М) и оболочный гликопротеид (Е). Инфицирующая зрелая частица вируса диаметром примерно 50 нм содержит 180 копий гликопротеина Е [3]. Это говорит о том, что гликопротеин Е является доминирующей мишенью нейтрализующих антител, и, следовательно, отличной мишенью для создания лабораторных методов детекции вируса Западного Нила.

Наиболее широко используемым диагностическим инструментом детектирования ВЗН является иммуноферментный анализ на антиген, сероконверсия антител, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, анализ нейтрализации и изолирование вируса [4].

Перспективное аналитическое устройство для лабораторного анализа на вирус Западного Нила – нанопроволочный биосенсор на основе полевого транзистора с изолированным затвором (биосенсор). Биосенсор состоит из полевого транзистора (два электрода – исток и сток, между которыми расположена кремниевая нанопроволока) и слоем рецепторов на его поверхности. Протекание специфической реакции между рецепторами и молекулой-мишенью изменяет ток в цепи исток-сток, который регистрирует детектор и выводит информацию на экран гаджета. Использовать биосенсор можно непосредственно на месте оказания экстренной медицинской помощи за счёт мобильных размеров и регистрации сигнала в режиме реального времени с высокой чувствительностью.

Цель работы – детекция поверхностного гликопротеина E вируса Западного Нила с помощью биосенсора.

Экспериментальная часть

Биологический материал: моноклональные антитела, специфичные к флавивирусам (концентрация 1,7 мг/мл), рекомбинантный белок гликопротеина E вируса Западного Нила – WEF (концентрация 0,0089 мг/мл), рекомбинантный белок ВИЧ – p24 (концентрация 0,625 мг/мл) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Химические реактивы: (3-аминопропил) триэтоксисилан (АПТЭС), перекись водорода 3,3'-дителио[сульфосукцинимидилпропионат] (ДТССП) (Sigma Aldrich, США); дистиллированная вода; этанол (Ленреактив, Россия). *Структура биосенсора.* Массив из двадцати полевых транзисторов 1, 2, 4–9, 11–14, 16–21, 23, 24 изготовлен на кремниевом кристалле микросхемы. Топология микросхемы представлена в [5]. В центре на поверхности кристалла расположен электрод заземления, выполненный из золота (позиции 3, 10). Напряжением на подзатворе полевых транзисторов управляли с помощью выводов 15, 22. Микросхемы изготовлены ООО «ДЦ МБТ «Вега» (г. Новосибирск, Россия). После нанесения специфических рецепторов на поверхность полевых транзисторов они приобретает свойства биосенсора и способны осуществлять специфическую детекцию молекулы-мишени. Электрические показания биосенсоров снимали с помощью прецизионного измерительного блока PXIe 4163 (National Instruments, США) с относительными погрешностями измерения напряжения 0,05 % и тока 0,10 %.

Детекция гликопротеина E. Очистку поверхности биосенсора проводили 10 %-м раствором H₂O₂ при комнатной температуре в течение 10 минут. Промывали дистиллированной водой. Процедуру проводили 3 раза. Поверхность модифицировали 1,5%-м раствором АПТЭС в этаноле в течение 30 минут при комнатной температуре. После промывали этанолом и сушили при комнатной температуре. Активировали NH₂-группы АПТЭС 0,1 мМ ДТССП в 10 мМ фосфатно-солевом буфере в течение 10 минут. Далее наносили разведенные в дистиллированной воде антитела (90 минут, комнатная температура). Не связавшиеся антитела удаляли водой. Измеряли ток на холостом ходу. Далее добавляли воду, после стабилизации сигнала - величины тока в цепи исток-сток (I_{ds}), затем вносили анализируемые пробы – белок WEF в концентрациях 10 пг/мкл, 100 пг/мкл, 1000 пг/мкл, 10 нг/мкл, 89 мкг/мкл. В качестве контроля неспецифического сигнала проводили детекцию рекомбинантного белка p24 по аналогии с детекцией WEF.

Результаты

Результаты эксперимента по детекции поверхностного гликопротеина E вируса Западного Нила представлены в виде сенсограмм (рис. 1) – зависимости безразмерной величины тока $\Delta I_{ds}/|I_{ds0}|$, выраженной в относительных единицах, от времени:

$$R = \left| \frac{\Delta I_{ds}}{I_{ds}^0} \right| = \left| \frac{I_{ds} - I_{ds}^0}{I_{ds}^0} \right|,$$

где I_{ds} – сила тока в цепи исток-сток биосенсора после адсорбции частицы; I_{ds}^0 – исходная сила тока в цепи исток-сток биосенсора [6].

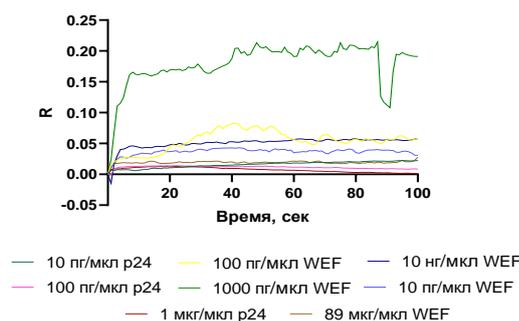


Рис. 1. Сенсограммы, полученные при детекции поверхностного гликопротеина E вируса Западного Нила и рекомбинантного белка р24

Как видно из рис. 1, биосенсор реагировал на внесение антигена WEF с концентрацией 10 пг/мкл. Увеличение концентрации антигена до 1000 пг/мкл приводило к увеличению величины тока в цепи исток-сток. Наибольший сигнал биосенсора наблюдался при детекции 1000 пг/мкл WEF. Уровень сигнала биосенсора при внесении 10 нг/мкл антигена аналогичен с сигналом при детекции 10 пг/мкл и 100 пг/мкл. Последующее увеличение концентрации до 89 мкг/мкл приводило к уменьшению сигнала биосенсора до уровня неспецифического сигнала от адсорбции рекомбинантного белка р24 ВИЧ. Это связано с сокращением количества свободных антител на поверхности напороволоки. Из полученных результатов можно сделать вывод, что диапазон чувствительности биосенсора варьируется от 10 пг/мкл до 10 нг/мкл белка WEF. Внесение рекомбинантного белка р24 в концентрациях 10 пг/мкл, 100 пг/мкл и 1 мкг/мкл практически не изменяло величину тока. Сигнал от неспецифического взаимодействия р24 с антителами в районе шума. Таким образом, можно констатировать, что на поверхности биосенсора происходит специфическое связывание антител с WEF.

Заключение

Результаты, полученные в работе, показали, что метод на основе разработанного биосенсора является перспективным для детекции гликопротеина E вируса Западного Нила в диапазоне концентраций 10 пг/мкл–10 нг/мкл.

Работа выполнена в рамках темы ГЗ-21/21 плана основных мероприятий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Список источников

1. De Madrid A. T., Porterfield J. S. The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study // Journal of General Virology. – 1974. – Vol. 23, № 1. – P. 91–96.
2. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Роспотребнадзор продолжает мониторинг ситуации с заражением лихорадкой Западного Нила [Электронный ресурс]. – URL: https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=28278&sphrase_id=5498521 (дата обращения: 05.02.2025).
3. Chancey C., Grinev A., Volkova E., Rios M. The global ecology and epidemiology of West Nile virus // BioMed Research International. – 2015. – Vol. 2015, № 1. – Article 376230.
4. Austin S.K., Dowd K.A. B cell response and mechanisms of antibody protection to West Nile Virus // Viruses. – 2014. – Vol. 6, № 3. – P. 1015–1036.
5. Патент RU 223220 U1 РФ МПК G01N27/414. Биосенсор для индикации биологических частиц / В.М. Генералов, А.В. Глухов, В.К. Грабежова и др. Заявлено 21.11.2023; Опубл. 08.02.2024, Бюл. № 4. – 17 с.
6. Наумова О.В., Фомин Б.И. Оптимизация отклика нанопроволочных биосенсоров // Автометрия. – 2016. – Т. 52, № 5. – С. 21–25.

УДК 578.52

**Анализ генетической вариабельности вариантов вируса гепатита В,
циркулирующих на территории Сибирского региона**

А.С. Железнова

Научный руководитель: к.б.н., с.н.с. М.Ю. Карташов

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
Россия, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, 630559

E-mail: zheleznova_as@vector.nsc.ru

**Analysis of the genetic variability of hepatitis B virus variants circulating in the Siberian
region**

A.S. Zheleznova

Scientific Supervisor: Ph.D. M.Yu. Kartashov

State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Russia, Novosibirsk
Region, sett. Koltsovo, 630559

E-mail: zheleznova_as@vector.nsc.ru

Abstract. *The aim of the work is to assess the prevalence of hepatitis B virus mutations in patients in the Siberian region. Blood plasma samples obtained from 701 patients from Novosibirsk region, Republics of Gorny Altai and Yakutia. Nucleotide sequences for genotype identification and mutation detection were obtained using NGS. In the examined group, the viral subgenotype D2 was the most prevalent (34,5 %) compared with subgenotypes D3 (30,9 %), D1 (27,3 %), A2 (7,3 %). Escape- mutations were found in 38,18 % of HBV isolates in the studied samples, of which A128V is the most common. Among the examined HBV variants, drug resistance mutations were not detected. Mutations of the Core-region and the X gene were found in all HBV isolates, which serves as a prognostic marker of disease progression. The high prevalence of immune escape and mutations of the Core-region and the X gene potentially associated with false-negative result of HBsAg screening, prophylaxis failure, and disease progression imposes a serious problem.*

Keywords: *hepatitis B virus, mutation, genotype, HBV- infection.*

Введение

Инфекция, вызванная вирусом гепатита В (ВГВ), является серьезной проблемой здравоохранения во всем мире [1]. Вследствие особенностей репликации вируса, для ВГВ характерен высокий уровень мутаций, что приводит к возникновению клинически значимых мутаций во всех генах (preS1/preS2/S, preCore/Core, P и X) [1]. Точечные мутации и делеции S-гена могут приводить к затруднению диагностики ВГВ-инфекции и инфицированию вакцинированного населения [2]. Аминокислотные замены в белке полимеразы (ген P) могут вызывать прямую устойчивость к противовирусной терапии (например, такими препаратами как Адефовир, Энтекавир и др.) [3]. Ген Core кодирует белок нуклеокапсида (НВсAg) и е-антиген (НВеAg). Мутации в этих участках в основном вызывают хорошо известный НВеAg-негативный гепатит, а также ряд мутаций Core-области связан с более тяжелым течением гепатита [4]. Ряд мутаций X-гена и аминокислотных замен L-НВсAg (Ген S) связывают с развитием ГЦК [4].

Целью работы является анализ распространенности клинически значимых мутаций среди генетических вариантов ВГВ, циркулирующих на территории Сибирского региона (Новосибирская область, Республики Горный Алтай и Якутия).

Экспериментальная часть

Скрининг исследуемых сывороток, полученных от пациентов Новосибирской области (493 образца), а также Республик Горный Алтай (128 образца) и Якутия (80 образцов) на

наличие генетического материала ВГВ проводился методом ПЦР-РВ с использованием набора реагентов «АмплиСенс HBV-FL». Положительные образцы (55) отбирали для дальнейшего определения полногеномных последовательностей ВГВ методом высокопроизводительного секвенирования на платформе IlluminaMiSeq путем таргетного обогащения разработанными нами олигонуклеотидными праймерами, перекрывающими полный геном ВГВ. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен решением этического комитета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 5 от 21.07.2022).

Генотипы и субгенотипы выявленных генетических вариантов ВГВ были определены с помощью методов филогенетического анализа. Определение серотипов проводилось на основе анализа выведенной аминокислотной последовательности HBsAg положениях 122, 127, 140, 159 и 160 [1]. Был проведен обширный анализ литературы, посвященной клинически значимым мутациям ВГВ, по итогам которого был составлен список мутаций лекарственной резистентности, мутаций ускользания от иммунитета и мутаций, связанных с ГЦК, в соответствие которым полногеномные последовательности были проанализированы.

Результаты

Распространенность генотипов и серотипов. Обнаружено, что преобладающим среди выявленных изолятов генотипом является D (рис. 1, б), при этом распределение по субгенотипам следующие: D2 – 34,5 % (19/55; 95 % ДИ 23,4–47,7), D3 – 30,9 % (17/55; 95 % ДИ 20,3–44,0), D1 – 27,3 % (15/55; 95 % ДИ 17,3–40,2), A2 – 7,3 % (4/55; 95 % ДИ 2,9–17,2). (рис. 1, б) Распределение генотипов и субгенотипов ВГВ в исследуемой выборке соответствует данным по стране [5].

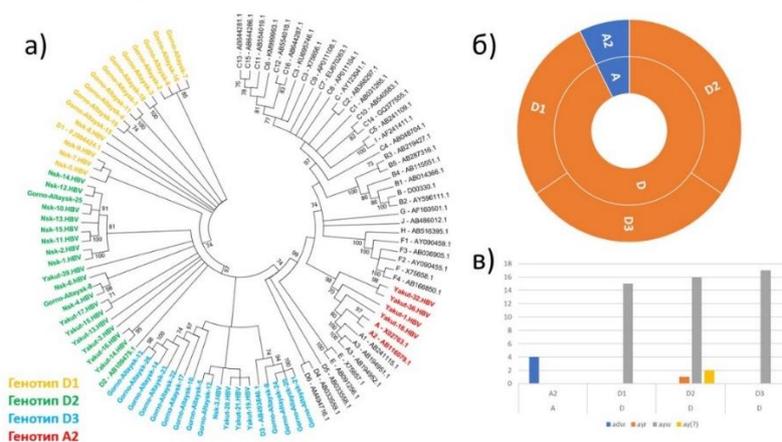


Рис. 1. Генотипирование полученных изолятов ВГВ (а). Анализ общей распространённости генотипов (б) и серотипов (в), циркулирующих на территории Сибири

Анализ серотипов показал, что наиболее распространённым серотипом является ayw (ayw1, ayw2 и ayw3) – 87,3 % (48/55, 95 % ДИ: 75,9–93,7). Распространённость серотипов adw (adw2) и ayg составляет 7,3 % (4/55, 95 % ДИ: 2,9–17,3) и 1,8 % (1/55, 95 % ДИ: 0,3–9,6) соответственно. Для двух последовательностей определить 3 антигенную детерминанту оказалось затруднительно вследствие мутаций в 127 положении (серотип ay(?)). При этом наблюдалось соответствие серотипов генотипам (рис. 1, в): генотипу А соответствует серотип adw (adw2), генотипу D – серотип ayw (ayw1, ayw2 и ayw3). Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что существует значительная взаимосвязь между генотипами ВГВ и серотипами полученных изолятов, что также согласуется с литературными данными [5].

Анализ мутаций HBsAg. В каждой из 55 полногеномных последовательностей была обнаружена хотя бы одна мутация HBsAg. Escape- мутации, обнаружены в 38,18 % последовательностей (21/55, 95 % ДИ: 26,5–51,3), при этом мутации, затрагивающие а-детерминанту (аминокислоты 124–147), были обнаружены в 25,5 % последовательностей

(14/55, 95 % ДИ: 15,8–38,3). Кроме того были обнаружены мутации в положениях 100, 101, 120 (описанные как мутации ускользания), 159 (мутации, вызывающие резкое снижение репликации и секреции вирионов), а также 118, 160 и 164 (мутации, изменяющие антигенность белка и его распознавание антителами). Наиболее распространённой среди выявленных изолятов мутацией HBsAg, устойчивым к вакцине, является A128V.

Анализ мутаций устойчивости к противовирусным препаратам. Мутаций лекарственной резистентности не обнаружено.

Анализ мутаций, связанных с прогрессированием заболевания (ГЦК, ЦП). Мутации гена С и Х, связанные с прогрессированием заболевания обнаружены во всех анализируемых вариантах ВГВ, в то время как мутаций L-HBsAg не обнаружены.

Мутации ВСР (1762Т/Г1764А) обнаружены в 17/55 полногеномных последовательностях ВГВ. Среди мутаций PreCore наиболее распространённой является A1896G (32/55), которая блокирует синтез HBeAg на уровне трансляции. К другим обнаруженным мутациям PreCore относятся H5D (6/55) и G29D (25/55). Обнаруженные мутации Core, связанные с прогрессированием гепатита В: F24Y (2/55), E64D (5/55), E77Q (6/55), A80I/T/V (16/55), E83D (55/55); с дополнительной клинической значимостью ускользания от иммунитета: L116I/V/G (47/55), E113Q (7/55), T114P/V (2/55), A131P (7/55).

Среди мутаций гена Х наиболее распространёнными являются тройная мутация V5M/L+K130M+V131I (29,1 % последовательностей ВГВ (16/55, 95 % ДИ:18,8–42,1)) и H94Y (14,5 % последовательностей (8/55, 95 % ДИ: 7,6–26,1)).

Заключение

Таким образом, существует сильная корреляция между генотипом ВГВ и серотипом, при этом распространённость субгенотипов D1, D2, D3 и A2 в исследуемых выборках составляет 27,3, 34,5, 30,9 и 7,3 % соответственно. Генотипы А и D соответствуют серотипам adw и ауw соответственно. Мутации, иммунного ускользания были обнаружены во 38,18 % изолятов ВГВ в исследуемых выборках, из которых наиболее распространённой является A128V. Мутации лекарственной резистентности не обнаружены. Мутации Core-области и гена Х обнаружены во всех изолятах ВГВ, что служит прогностическим маркером прогрессирования заболевания.

Полученные в ходе исследования результаты расширяют возможности контроля вирусных гепатитов, поскольку могут быть основой для персонализированного подхода в терапии ВГВ- инфекции. Кроме этого, выявление распространённости мутаций вакцинного ускользания является основой для понимания эффективности превентивных мер в отношении ВГВ- инфекции и их своевременной корректировки.

Список литературы

1. Al-Qahtani A.A., Pourkarim M.R., Trovão N.S., Vergote V, et al. Molecular epidemiology, phylogenetic analysis and genotype distribution of hepatitis B virus in Saudi Arabia: Predominance of genotype D1 // *Infect Genet Evol.* – 2020. – P. 104051. – DOI: 10.1016/j.meegid.2019.104051.
2. Qin Y., Liao P. Hepatitis B virus vaccine breakthrough infection: surveillance of S gene mutants of HBV // *Acta Virologica* – 2018. – Vol. 62(2). – P. 115–121. DOI: 10.4149/av_2018_210.
3. Gao S., Duan Z.P., Coffin C.S. Clinical relevance of hepatitis B virus variants // *World J Hepatol* – 2015. – P.1086–1096. – DOI: 10.4254/wjh.v7.i8.1086.
4. Choi Y.M., Lee S.Y., Kim B.J. Naturally Occurring Hepatitis B Virus Mutations Leading to Endoplasmic Reticulum Stress and Their Contribution to the Progression of Hepatocellular Carcinoma // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20 (3). – P. 597. – DOI: 10.3390/ijms20030597.
5. Полянина А.В., Быстрова Т.Н. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика вируса гепатита в условиях массовой вакцинопрофилактики // *Журнал МедиАль.* – 2019. – № 2 (24). – С. 10–13.

УДК 57.085.23

Влияние степени пористости полилактидных матриц на адгезию клетокК.Е. Заболотная, А.А. Суханова

Научный руководитель: к.б.н. А.А. Суханова

Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнева
Россия, г. Красноярск, пр. им. газеты Красноярский Рабочий, 31,660000Email: zabolotnaya1999@bk.ru**Influence of the degree of porosity of polylactide matrices on cell adhesion**K.E. Zabolotnaya, A.A. Sukhanova

Scientific supervisor: Ph.D. A.A. Sukhanova

Siberian State University of Science and Technology named after Academician M.F. Reshetnev
Russia, Krasnoyarsk, Krasnoyarsk Worker Newspaper str., 31.660000Email: zabolotnaya1999@bk.ru

Abstract. *In this study, we used 3D printing by fused deposition modeling (FDM) to print matrices with varying degrees of occupancy from 95 % to 99 % and evaluated the adhesion and proliferation of fibroblast and endotheliocyte cells on the surface of polylactide matrices. The microstructure and porosity of the obtained scaffolds are shown by scanning electron microscopy. Cytotoxicity assessment was performed in vitro on a culture of human fibroblasts of the FRSN-1 line and endotheliocytes of the EA.hy926 line.*

Key words: *polylactide, matrix, fibroblasts, endothelial cells.*

Введение

Инженерия костной ткани представляет собой быстро развивающуюся область, направленную на восстановление и/или замену поврежденных или утраченных тканей. Одним из ключевых объектов исследования в этой области являются полимерные матрицы, которые служат каркасом для роста клеток и поддерживают формирование костной ткани de novo [1]. Для получения таких матриц используют биоразлагаемые полимеры, которые можно перерабатывать различными методами, в том числе 3Д-печатью. Печать полимерами предлагает множество преимуществ для создания имплантатов (выбор размера пор, точность, моделирование) и конструкций для регенерации тканей [3]. Полилактид (ПЛ) – это один из наиболее популярных термопластов, используемых в 3Д-печати, особенно в области аддитивных технологий, таких как FDM (метод послойного наплавления). Для костной инженерии ПЛ и его сополимеры имеют ряд важных характеристик: биосовместимость, отсутствие воспалительных реакций организма после имплантации, удовлетворительные механические свойства [2].

Цель – исследование влияния степени заполненности 3Д матриц из полилактида на адгезию клеточных культур фибробластов и эндотелиоцитов.

Экспериментальная часть

Для 3Д-печати матриц был использован филамент полилактида диаметром 1,75 мм марки Kingroon. Матрицы с разной степенью заполненности (95 %, 96 %, 97 %, 98 % и 99 %) были получены на 3Д принтере GHOST 6 с помощью программного обеспечения Repetier-Host, FDM. Для оценки объемной микроструктуры и пористости, полученных матриц использовали электронный микроскоп (ТМ 4000 «Hitachi», Япония). Затем на матрицах в течение 7 суток культивировали два вида клеток: фибробласты человека линии FRSN-1 и эндотелиоциты линии EA.hy926 для оценки цитотоксичности.

Клетки рассеивали на матрицах, по 10 т.кл./лунку, в качестве контроля – культуральный пластик, пустые лунки планшета. Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе, в 5 % атмосфере

CO₂, при 37 °С, в питательной среде DMEM с добавлением 10 % сыворотки и 1 % раствора антибиотиков (10 мг/мл стрептомицин/10000 Ед пенициллин). Брали 2 повторности, 1 группа контроля (клетки интактные), опытные группы. Несколько временных точек: 1, 4 и 7 суток. Для МТТ теста из лунок планшета удаляли питательную среду с неприкрепившимися или погибшими клетками, добавляли по 1 мл питательной среды с раствором МТТ, инкубировали 3 часа. Затем удаляли питательную среду, образовавшийся формазан растворяли в ДМСО, по 100 мкл из каждой лунки переносили в 96-луночный планшет и снимали оптическую плотность при $\lambda = 570$ нм на микропланшетном ридере (SpectroStar Nano). Результаты нормировали относительно контроля.

Результаты

Получены 3 Д-матрицы на основе полилактида, весом 0,12 г., высотой 2 мм и диаметром 10 мм.

Внешний вид и СЭМ изображения полученных матриц, представлены на рис. 1. На СЭМ-изображениях видно, что поверхность матриц имеет решётчатое строение (кроме матрикса с 99%-й заполненностью), при этом размер пор различается в зависимости от заполненности матриц. Максимальный диаметр пор (280–300 мкм) отмечен у образца с 95%-й заполненностью. Матрицы 96–97%-й заполненностью имели близкие по диаметру размеры пор (230–260 мкм).

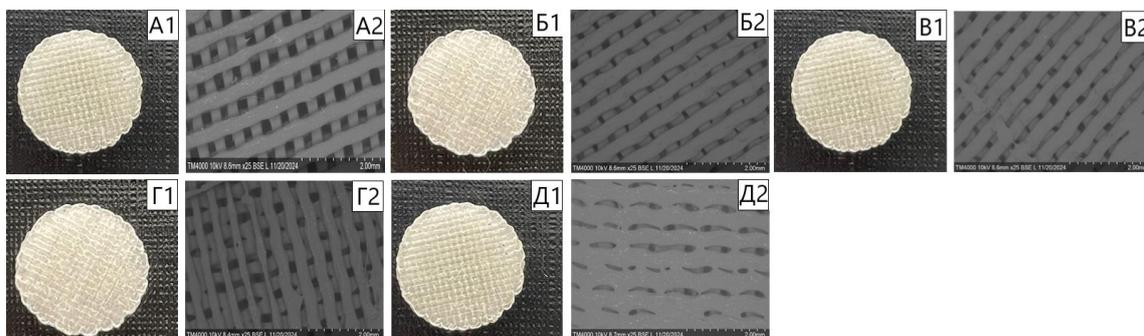


Рис. 1. А-матрикс с 95%-й заполненностью (А1-внешний вид, А2-СЭМ изображение), Б-матрикс с 96%-й заполненностью (Б1-внешний вид, Б2-СЭМ изображение), В-матрикс с 97%-й заполненностью (В1-внешний вид, В2-СЭМ изображение), Г-матрикс с 98%-й заполненностью (Г1-внешний вид, Г2-СЭМ изображение), Д-матрикс с 99%-й заполненностью (Д1-внешний вид, Д2-СЭМ изображение)

У матриц с 98%-й заполненностью линии решетки частично слились из-за чего размер пор в образце значительно варьировал в диапазоне 140–300 мкм. Для образца с 99%-й заполненностью наблюдалось слияние линий решетки, которое привело к образованию вытянутых пор на сплошной поверхности.

Оценка цитотоксичности полученных 3Д-матриц с помощью МТТ-теста в культуре фибробластов человека FRSN-1 показала, что количество жизнеспособных клеток в опытных группах со временем снижалось по сравнению с контролем на 70 %, 82 %, 82 %, 65 % и 74 % у матриц с 95%-й, 96%-й, 97%-й, 98%-й и 99%-й заполненностью, соответственно. На 7 сутки культивирования относительно контроля самый высокий показатель зарегистрирован у образца с 98 % заполненностью (рис. 2). Для эндотелиоцитов линии EA.hy926 не было достоверных отличий между образцами матриц, количество клеток относительно контроля составило 2,1 %, 3,3 %, 3,5 %, 5,7 % и 3,4 % – 95%-й, 96%-й, 97 %-ной, 98%-й и 99%-й заполненности соответственно. На 4 сутки эксперимента количество жизнеспособных метаболически активных клеток начало увеличиваться и на 7 сутки превысило показатели, полученные через 24 часа после засева матриц (рис. 3).

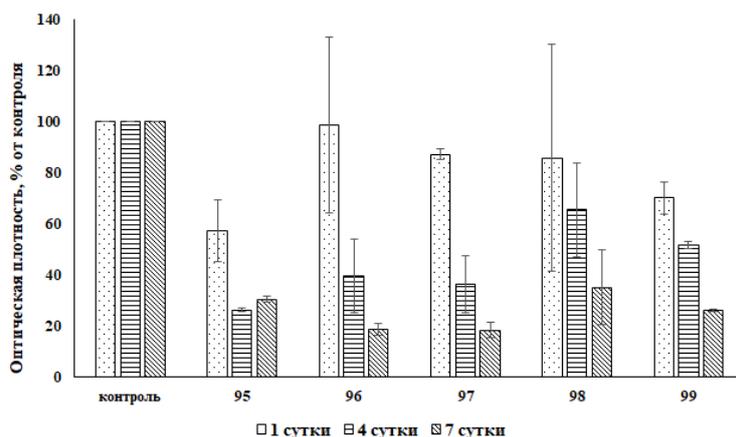


Рис. 2. Оценка жизнеспособности фибробластов

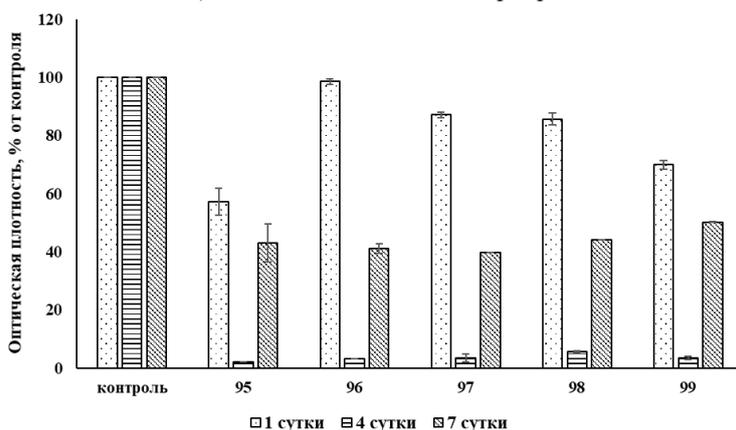


Рис. 3. Оценка жизнеспособности Эндотелиоцитов

Заключение

Таким образом, в данной работе установлено, что при оценке жизнеспособности засеянных клеток оптимальная заполненность матрикса для прикрепления клеток фибробластов составляет 99%-й заполненностью, для клеток эндотелиоцитов – 98%-й заполненностью, с размером пор от 140 до 300 мкм. Можно сделать предположение о том, что размер пор напрямую связан с прикреплением и пролиферацией клеток – чем больше размер пор, тем сложнее клеткам прикрепиться к матриксу.

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках госзадания на выполнение исследования по теме «Исследование закономерностей химико-биотехнологического синтеза биоразлагаемых полимеров» (проект № FEFE-2024-0027).

Список литературы

1. Black C.R.M. et al. Bone tissue engineering // Current molecular biology reports. – 2015. – Vol. 1. – P. 132–140.
2. Gremare A. et al. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2018. – Vol. 106. – P. 887–894.
3. Kroeze R.J. et al. Biodegradable polymers in bone tissue engineering // Materials. – 2009. – Vol. 2. – P. 833–856.

УДК 617.741-004.1-06:[617.735:617.725]-002-02:611.844.1.068.1

Структура морфологических изменений хрусталика при осложненной катаракте на фоне хронического персистирующего воспаления периферических отделов сетчатки и плоской части цилиарного тела

Д.Е. Зинович, Е.В. Иванова, В.В. Иванова

Научный руководитель: доцент, д.м.н. Ю.И. Заpusкалова
Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050
Общество с ограниченной ответственностью «Гранд Ретина»,
Россия, г. Томск, ул. Мокрушина, 9, строение 16, 634045
e-mail: i_kate@mail.ru

The structure of morphological changes of the lens in complicated cataract in patients with chronic inflammation of peripheral retina and pars plana of the ciliary body

D.E. Zinovich, E.V. Ivanova, V.V. Ivanova

Scientific Supervisor: Ass. Prof., Dr. Y.I. Zapuskalova
The Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovskiy trakt, 2, 634050
²LLC «Grand Retina», Russia, Tomsk, Mokrushina str, 9, p.16, 634045
e-mail: i_kate@mail.ru

Abstract. *This study aims to identify the morphological features of complicated cataracts in the setting of intermediate uveitis among young people and to contribute to the effective identification of patients with risks of intermediate uveitis to prescribe effective therapy and improve their quality of life.*

Key words: *cataract, optical coherence tomography, intermediate uveitis.*

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, во всём мире насчитывается около 2,2 миллиарда человек со слепотой и слабовидением. Катаракта занимает одно из ведущих мест среди обратимого нарушения зрения в мире, и больше 70 % случаев классической возрастной катаракты развивается среди людей старше 70 лет. При этом на сегодняшний день во всём мире наблюдается «омоложение» катаракты, поэтому нам необходимо обратить пристальное внимание на пациентов от 18 до 52 лет, так как в их случае динамика и морфология помутнения хрусталика не соответствует классической картине сенильной катаракты [1].

Этиологические факторы, вызывающие развитие катаракты у лиц данной возрастной группы, разнообразны: травматические, связанные с нарушением обмена веществ, токсические (в том числе инфекционные и медикаментозные). При этом выделяется группа пациентов, у которых на первый взгляд не представляется возможным определить этиологию катаракты [1–3].

При более глубоком обследовании у пациентов данной группы зачастую выявляются признаки хронического воспаления периферических отделов сетчатки – хронического периферического увеита (ХПУ), что в некоторых случаях подтверждается уже после проведенного хирургического лечения [4]. Развитие катаракты при остром течении периферического увеита описано и составляет, по данным литературы, от 9 до 57 % [5], в то же время механизм развития осложненной катаракты при наличии хронического воспаления на крайней периферии сетчатки не имеет еще детального описания. А опасность ХПУ для зрения определяется во многом развитием его отдалённых осложнений, таких как кистозный макулярный отёк, офтальмогипертензия, отслоение сетчатки [6].

Экспериментальная часть

Целью исследования было выделение морфологических особенностей осложненной катаракты на фоне ХПУ среди лиц молодого возраста. В исследование были включены 358 пациентов в возрасте от 18 до 52 лет (средний возраст 38,2 +/- 5,3 лет), мужчин 169 человек, женщин 189 человек. Все пациенты были разделены на две группы: основная включала пациентов с диагностированным ХПУ и составляла 203 пациентов (203 глаз), и группа сравнения, в которую вошли пациенты без сопутствующей воспалительной патологии глаз (155 пациентов, 155 глаз). Критериями исключения являлись возраст менее 18 и более 52 лет, сопутствующие заболевания глаза, травмы глаз, общесоматические заболевания и приём лекарственных препаратов, способные вызвать развитие осложненной катаракты.

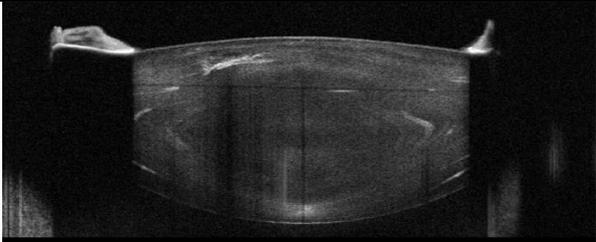
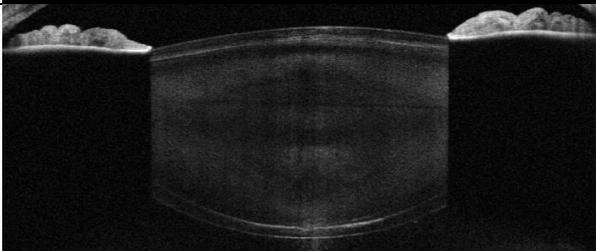
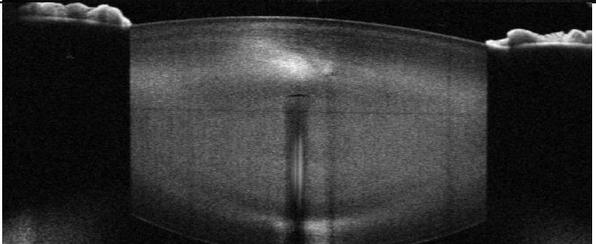
Пациентам обеих групп проводились исследования: биомикроскопия с фотофиксацией (Mediworks, Китай), оптическая когерентная томография (ОКТ) структур передней камеры в условиях узкого и медикаментозно расширенного (тропикамид 0,5 %) зрачка (Solix, Optovue, США).

Результаты

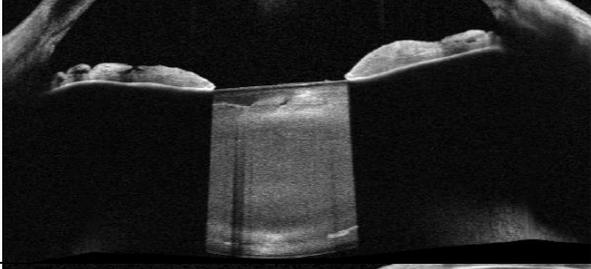
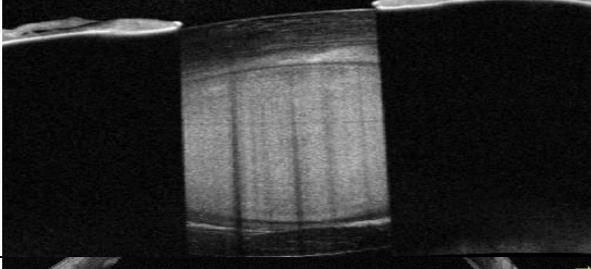
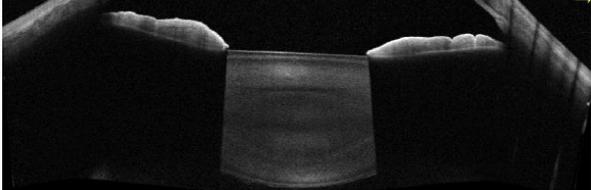
В структуре морфологических изменений хрусталика наиболее часто выявлялись пылевидные помутнения периферического кортекса, субкапсулярные помутнения, субкапсулярные вакуоли, спицевидные и клиновидные помутнения периферического кортекса, уплотнение же ядра встречалось преимущественно среди пациентов 40–52 лет, при этом общий процент наличия помутнений в хрусталике по типу осложненной катаракты среди пациентов основной группы составил 100 %, среди же пациентов группы сравнения - только 76,1 %, при этом в обеих группах чаще всего встречались комбинации помутнений хрусталика. Сравнительные данные среди пациентов двух групп приведены в таблице 1.

Таблица 1

Сравнительные данные пациентов и примеры патологоанатомических изменений хрусталика в исследуемых подгруппах

Вид помутнения	Основная группа (n глаз, %)	Группа сравнения (n глаз, %)	Примеры
Пылевидные помутнения периферического кортекса	203, 100,0 %	29, 18,7 %	
Субкапсулярные помутнения (в том числе по типу «задней чаши»)	93, 45,8 %	0	
Субкапсулярные вакуоли	87, 42,8 %	21, 13,5 %	

Продолжение таблицы 1

Спицевидные и клиновидные помутнения периферического кортекса	116, 57,1 %	7, 4,5 %	
Уплотнение ядра	91, 44,8 %	58, 37,4 %	
Отсутствие помутнений	0	37, 23,9 %	

Заключение

Таким образом, в результате исследования мы выделили основные структурные изменения морфологии хрусталика глаза у молодых пациентов, развивающиеся на фоне ХПУ. Эти данные имеют большое значение для практикующих специалистов, способствуя эффективному выявлению пациентов группы риска наличия ХПУ, проведение дополнительного обследования структур крайней периферии глазного дна, назначение своевременного противовоспалительного лечения, что поможет в дальнейшем избежать нарушающих зрение осложнений и сохранить высокое качество жизни для данной категории пациентов.

Список литературы

1. Olson R.J., Braga-Mele R., Chen S.H. et al. Cataract in the Adult Eye Preferred Practice Pattern® // *Ophthalmology*. – 2017. – Vol. 124, № 2. – P. 1–119.
2. Tekin K., Erol Y.O., Sargon M.F. et al. Effects of Fuchs uveitis syndrome on the ultrastructure of the anterior lens epithelium: A transmission electron microscopic study // *Indian journal of ophthalmology*. – 2017. – Vol. 65, № 12. – P. 1459.
3. Shiel, A., Hejtmancik J.F. Genetics of human cataract // *Clinical genetics*. – 2013. – Vol. 84, № 2. – P. 120–127.
4. Ozdal P.C., Berker N., Tugal-Tutkun I. Pars planitis: Epidemiology, clinical characteristics, management and visual prognosis // *J Ophthalmic Vis Res*. – 2015. – Vol. 10. – P. 469–480.
5. Bonfioli A.A., Damico F.M., Curi A.L.L. et al. Intermediate uveitis // *Seminars in ophthalmology*. – 2005. – Vol. 20. – P. 147–154.
6. Prieto-del-Cura M., González-Guijarro J.J. Risk factors for ocular complications in adult patients with uveitis // *European journal of ophthalmology*. – 2020. – Vol. 30, № 6. – P. 1381–1389.

УДК 581.1:577.175.1:635.21

Гормональная регуляция устойчивости регенерантов картофеля к гипотермииМ. Кадырбаев^{1,2}, Е.В. Бойко¹Научный руководитель: профессор, д.б.н. И.Ф. Головацкая¹¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050²Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050E-mail: kadyrbaev.maks@mail.ru**Hormonal Regulation of Potato Regenerant Resistance to Hypothermia**M. Kadyrbaev^{1,2}, E.V. Boyko¹Scientific Supervisor: Prof., Dr. I.F. Golovatskaya¹¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050²Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovsky trakt, 2, 634050E-mail: kadyrbaev.maks@mail.ru

Abstract. *The effect of pre-treatment with melatonin (Mel), indole-3-acetic acid (IAA), and salicylic acid (SA) on cold tolerance of potato regenerants was studied. Hormone treatment significantly increased plant resistance to hypothermia (4°C, 3 days) through different mechanisms. Mel affected the photosynthetic apparatus, IAA regulated growth processes, and SA activated the antioxidant system. IAA showed the highest efficiency in protecting plants from cold stress.*

Key words: *Solanum tuberosum, plant hormones, cold stress, antioxidant system, regenerants, melatonin, IAA, salicylic acid.*

Введение

В условиях нестабильности климата всё чаще наблюдаются нарушения оптимальных температурных режимов для возделывания сельскохозяйственных культур. Низкие температуры вызывают окислительный стресс, существенно влияющий на восстановительные процессы в растениях [1]. Эта проблема особенно актуальна для картофеля (*Solanum tuberosum* L.), занимающего четвертое место среди продовольственных культур по объемам производства [2].

Фитогормоны играют ключевую роль в регуляции защитных механизмов растений при стрессах. Мелатонин (Мел) выступает как природный антиоксидант [3], защищая растения от окислительного стресса. Как показано в наших исследованиях [4, 5], мелатонин может модифицировать действие индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). ИУК регулирует процессы роста и развития растений, а также формирует адаптивный ответ на стрессовые воздействия. Салициловая кислота (SA) вовлечена в формирование системного приобретенного иммунитета и к негативным абиотическим факторам среды [6, 7].

Целью работы было изучение роли предварительной обработки мелатонином, ИУК и салициловой кислотой в регуляции холодоустойчивости растений-регенерантов картофеля.

Экспериментальная часть

Исследования проводили на растениях-регенерантах картофеля среднераннего сорта Луговской, полученных методом микроклонального размножения из апикальной (AP) и средней (CP) частей побега. 28-дневные регенеранты, сформированные на твердой питательной среде Мурасиге-Скуга в пробирках, адаптировали в течение 14 суток к жидкой 50 % среде МС и атмосферной к влаге. Корни растений обрабатывали растворами Мел, ИУК или SA в концентрации 0.1 мкМ в течение 4 ч. После промывания корней растения культивировали 7 суток, затем подвергали действию гипотермии (+ S 4°C) в течение 3 суток с последующим восстановлением при 22°C в течение 10 суток.

Анализировали морфометрические параметры, содержание фотосинтетических пигментов, пролина, аскорбиновой кислоты, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза – СОД, пероксидазы), суммарное содержание фенольных соединений, в том числе содержание индивидуальных флавоноидов.

Результаты

Установлено, что регенеранты, полученные из разных участков побега, различались по потенциалу роста и чувствительности к гипотермии. АР характеризовались большими размерами (большей длиной побега и накоплением биомассы) по сравнению с СР.

Предобработка гормонами существенно повышала холодоустойчивость регенерантов картофеля, что проявлялось в ускорении регенерации растений после стресса. Сравнение эффектов действия одинаковой концентрации разных фитогормонов показало, что каждый из гормонов действовал через специфические механизмы.

Обработка мелатонином способствовала повышению содержания фотосинтетических пигментов. В листьях СРМел+S увеличивалось содержание хлорофиллов *a* и *b* на 21 % и 28 % соответственно, а также каротиноидов на 18 % по сравнению с контролем. Согласно нашим исследованиям [5, 8], мелатонин регулирует окислительно-восстановительный баланс клеток. У обработанных Мел растений наблюдали повышение содержания пролина на 32 % и каротиноидов и снижение окислительного статуса (по интенсивности ПОЛ) на 25 %.

Растения, обработанные ИУК, демонстрировали наиболее эффективное восстановление после холодного стресса. Предобработка ИУК повышала ростовой потенциал растений, увеличивая длину корней на 51 % и площадь листовой поверхности на 64 % по сравнению с необработанными растениями после гипотермии. Также отмечали повышение содержания антиоксидантов аскорбиновой кислоты на 45 % и активности пероксидазы на 38 %. У АРИУК+S увеличивалось содержание фенольных соединений на 27 %, что свидетельствует об активации многокомпонентной антиоксидантной системы.

SA оказывала наиболее выраженное влияние на антиоксидантную систему, снижая интенсивность ПОЛ до конститутивного уровня у растений АРSA+S и СРSA+S. У обработанных SA растений наблюдали повышение активности СОД на 42 % и содержания антоцианов и суммы флавоноидов на 35 % и 29 % соответственно. Особенно интересным аспектом действия SA является изменение качественного состава флавоноидов в листьях СР. ВЭЖХ-анализ показал, что SA после гипотермии увеличивала содержание кверцетина в 8 раз и рутина в 2 раза за счет снижения уровня дигидрокверцетина.

Все исследованные гормоны влияли на водный обмен, повышая относительное содержание воды во всех органах растений после гипотермии. При этом у СРSA+S наблюдали полное восстановление водного статуса до уровня, характерного для нестрессированных растений.

Полученные нами результаты по фотосинтетическим показателям согласуются с данными И.А. Бычкова с соавторами [9], показавшими, что адаптация растений к холоду сопровождается повышением активности генов аппарата транскрипции хлоропластов. Наши данные дополняют предыдущее исследование [10], в котором было показано влияние мелатонина и ИУК на защитные механизмы регенерантов картофеля при холодном стрессе. Мы установили, что мелатонин эффективно защищает фотосинтетический аппарат, но его влияние на антиоксидантную систему менее выражено по сравнению с SA. Это могло быть связано с тем, что сам мелатонин может выступать антиоксидантом. Аналогичные результаты были получены нами ранее при изучении влияния SA на холодоустойчивость регенерантов картофеля [7].

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования предобработки гормонами для повышения холодоустойчивости растений картофеля. Защитное действие гормонов реализуется через различные компоненты антиоксидантной системы, что сказывается на изменении разных уровней метаболизма: мелатонин преимущественно влияет на фотосинтетический аппарат, ИУК – на ростовые процессы, а SA – на вторичный метаболизм. Наиболее эффективным оказалось применение ИУК, что может быть связано с ее комплексным влиянием на ростовые и защитные механизмы растений.

Понимание физиологического механизма выхода картофеля из холодового стресса является важным шагом для повышения устойчивости растений к холоду. Полученные результаты могут быть использованы для разработки способов повышения холодоустойчивости картофеля в практике растениеводства.

Результаты исследования получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России (проект № FSWM-2024-0009).

Список литературы

1. Титов А.Ф., Шиббаева Т.Г., Икконен Е.Н., Шерудило Е.Г. Реакции растений на ежесуточные кратковременные понижения температуры: феноменология и механизмы // Физиология растений. – 2020. – Т. 67, № 6. – С. 642–657.
2. Ding Y., Shi Y., Yang S. Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants // *New Phytol.* – 2019. – Vol. 222. – P. 1690–1704.
3. Tan D.X., Reiter R.J. An evolutionary view of melatonin synthesis and metabolism related to its biological functions in plants // *J. Exp. Bot.* – 2020. – Vol. 71. – P. 4677–4689.
4. Головацкая И.Ф., Бойко Е.В., Карначук Р.А. Роль мелатонина в регуляции ИУК-зависимых реакций растений в разных условиях освещения // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2017. – № 37. – С. 144–160.
5. Головацкая И.Ф., Бойко Е.В., Резниченко А.Е., Плюснин И.Н. Мелатонин и селен регулируют рост и окислительный статус клеточных культур *Saussurea orgaadayi in vitro*, полученных от разных эксплантов // Физиология растений. – 2020. – Т. 67, № 6. – С. 625–635. – DOI: 10.31857/S001533032005005X.
6. Arif Y., Sami F., Siddiqui H., Bajguz A., Hayat S. Salicylic acid in relation to other phytohormones in plant: a study towards physiology and signal transduction under challenging environment // *Environ. Exp. Bot.* – 2020. – Vol. 175. – P. 104040.
7. Головацкая И.Ф., Кадырбаев М.К., Бойко Е.В., Филонова М.В. Салициловая кислота повышает холодоустойчивость регенерантов *Solanum tuberosum*, регулируя функционирование антиоксидантной системы // Физиология растений. – 2023. – Т. 70, № 4. – С. 1–14. – DOI: 10.31857/S0015330323600018.
8. Кадырбаев М.К., Головацкая И.Ф., Сатканов М.Ж. Особенности морфогенеза и метаболизма регенерантов *in vitro*, полученных из различных фрагментов побега картофеля // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2021. – № 55. – С. 114–134. – DOI: 10.17223/19988591/55/7.
9. Бычков И.А., Кудрякова Н.В., Кузнецов Вл.В., Кузнецов В.В. Холодовой стресс активизирует экспрессию генов аппарата транскрипции хлоропластов у растений *Arabidopsis thaliana* // Доклады РАН. Сер. биологические науки. – 2020. – С. 463–467.
10. Golovatskaya I.F., Kadyrbaev M.K., Boyko E.V. Protective Role of Melatonin and IAA in the Regulation of Resistance of Potato Regenerants to Cold Stress // *Potato Research.* – 2023. – DOI: 10.1007/s11540-023-09642-8.

УДК. 616.12-092:615.22

Кардиопротекторный эффект алкалоида зонгорина при экспериментальной модели синдрома такотсубо

М. Килин, А.В. Мухомедзянов

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

Томский национальный исследовательский медицинский центр, НИИ кардиологии

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

E-mail: kilin112233@gmail.com

Cardioprotective effect of the songorine alkaloid in an experimental model of takotsubo syndrome

M. Kilin, A.V. Mukhomedzyanov

Scientific Supervisor: Prof., Ph.D. L.N. Maslov

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

E-mail: kilin112233@gmail.com

Abstract. *At present, a disease known as Takotsubo syndrome is a rare but dangerous condition observed in 0.6–2.5 % of patients with acute coronary syndrome. The in-hospital mortality rate ranges from 3.5 % to 12 %, which corresponds to the mortality rate of acute myocardial infarction. The primary etiology is considered to be severe emotional stress, which leads to excessive activation of the sympathetic-adrenal system. The study was conducted on 48 Wistar rats. Stress-induced cardiac injury was modeled by immobilizing the animals on their backs, after which the radiopharmaceutical ^{99m}Tc-pyrophosphate was administered to assess heart damage under emotional stress. Thus, it can be concluded that the alkaloid songorine may reduce stress-induced cardiac injury.*

Key words: *Takotsubo syndrome, alkaloid songorine.*

Введение

Стрессовая кардиомиопатия или синдром такотсубо (СТ) – редкое, но в то же время опасное заболевание, которое наблюдается у 0,6–2,5 % больных с общим коронарным синдромом. Госпитальная смертность сопоставима со смертностью при остром инфаркте миокарда с подъемом сегмента ST. СТ впервые был описан в Японии в 1990 году и получил своё название по аналогии с формой традиционного японского сосуда для ловли осьминогов – «такотсубо», которую приобретает левый желудочек при этом заболевании. Заболевание чаще диагностируется у женщин постменопаузального возраста, что, предположительно, связано с изменениями в гормональном фоне и чувствительностью к катехоламинам.

Основной этиологией принято считать выброс норадреналина из симпатических терминалей в миокарде или мобилизация адреналина из надпочечников на фоне эмоционального стресса. Повышенная концентрация катехоламинов может вызывать вазоконстрикцию, микрососудистую дисфункцию прямое токсическое воздействие на кардиомиоциты, приводя к развитию транзиторной дисфункции миокарда [1]. В настоящее время отсутствуют специфические методы лечения СТ, направленные на патогенетические звенья заболевания. В этой связи представляется актуальным поиск новых кардиопротекторных агентов, способных снижать повреждение миокарда при стресс-индуцированных состояниях.

Цель работы, оценить кардиопротекторный эффект алкалоида зонгорина при моделировании синдрома такотсубо.

Экспериментальная часть

Исследование было проведено на 48 крысах-самках Вистар. Стрессовое состояние моделировали двумя способами: методом иммобилизации животных на спине в течении

24 часов, а также однократным введением β -адреномиметика изопротерина в дозе 50 мг/кг, что вызывает клинические проявления СТ [2]. В течении суток животным трижды вводили внутрибрюшинно алкалоид зонгорин в дозе 10 мг/кг [3]. Для оценки степени повреждения миокарда использовался радиофармацевтический препарат ^{99m}Tc -пирофосфат, который избирательно накапливается в участках некроза и повреждения кардиомиоцитов. Измерение проводилось с использованием сцинтилляционного гамма-счетчика, результаты выражались в условных единицах накопления на грамм ткани. Статистический анализ проводился при помощи критерия Манна-Уитни с использованием пакета STATISTICA 13. Все данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (Ме [Q1; Q3]). Для межгруппового сравнения использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. Уровень статистической значимости принимался при $p < 0,05$.

Результаты

Алкалоид зонгорин уменьшил накопление ^{99m}Tc -пирофосфата на 25% по сравнению с группой стресс-контроля. Однако при стрессовой модели, вызванной введением изопротерина в дозе 50 мг/кг, использование зонгорина в той же дозе (10 мг/кг) не повлияло на уровень аккумуляции ^{99m}Tc -пирофосфата (рис. 1).

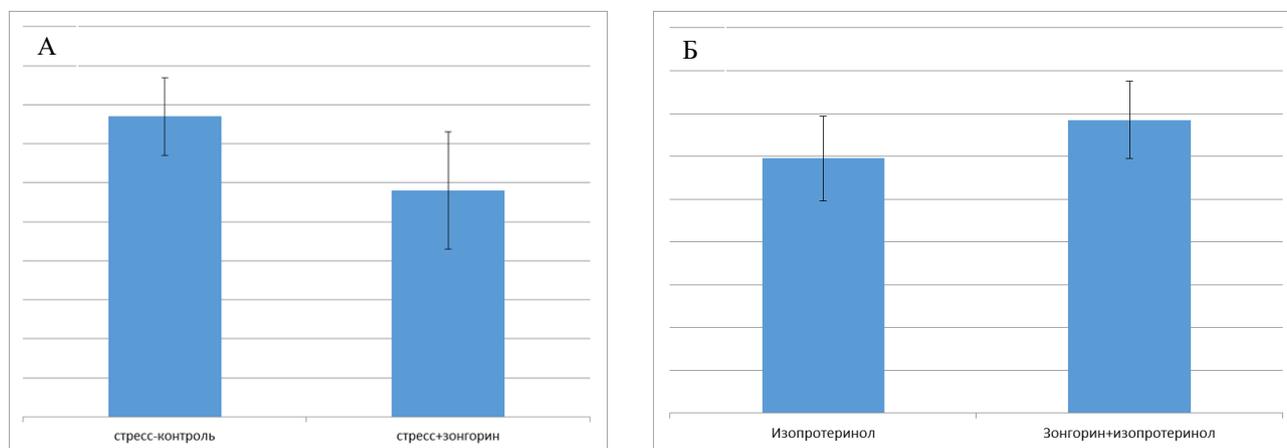


Рис. 1. Аккумуляция ^{99m}Tc -пирофосфата в ткани миокарда.

Стресс + зонгорин 10 мг/кг трехкратно внутрибрюшинно (А). Изопротеринол 50 мг/кг однократно внутрибрюшинно + зонгорин 10 мг/кг трехкратно внутрибрюшинно $p > 0.05$ (Б)

Результаты

Установлено, что алкалоид зонгорин способен уменьшать повреждение сердца при иммобилизационном моделировании стресс-индуцированного повреждения сердца.

Авторы выражает признательность профессору д.м.н., Л.Н. Маслову за консультативную помощь при планировании исследования, а также коллективу лаборатории экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии Томского НИМЦ за техническую помощь.

Источник финансирования: грант Томского НИМЦ «Рецепторный и сигнальный механизм кардиопротекторного, антиульцерогенного и антиинфицирующего эффектов алкалоида зонгорина».

Список литературы

1. Бощенко А.А., Курбатов Б.К., Килин М., и др. Роль β -адренорецепторов в стресс-индуцированном повреждении сердца // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т. 178, № 9. – С. 296–300. – DOI 10.47056/0365-9615-2024-178-9-296-300.

2. Tranter M.H., Redfors B., Wright P.T., Couch L.S., Lyon A.R., Omerovic E., Harding S.E. Hyperthermia as a trigger for Takotsubo syndrome in a rat model // *Front. Cardiovasc. Med.* – 2022. – Vol. 9. – doi.org/10.3389/fcvm.2022.869585
3. Нестерова Ю.В., Мухомедзянов А.В., Поветьева Т.Н., и др. Вовлечённость рецепторного аппарата в реализацию антиноцицептивной активности зонгорина // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2024. – Т. 178, № 10. – С. 426-430. – DOI 10.47056/0365-9615-2024-178-10-426-430.

УДК 004.942

**Численное моделирование напряженного состояния в системе «кость–имплантат»
при креплении с помощью винтов**В.В. Ким

Научный руководитель: профессор, д.ф.-м.н. И.Ю. Смолин
Институт физики прочности и материаловедения СО РАН,
Россия, г. Томск, пр. Академический, 2/4, 634055

E-mail: valeriiakim@ispms.ru**Numerical modeling of the stress state in the system "bone–implant"
when fastened with screws**V.V. Kim

Scientific Supervisor: Prof., Dr. I.Yu. Smolin
Institute of Strength Physics and Materials Science SB RAS
Russia, Tomsk, Akademicheskii str., 2/4, 634055

E-mail: valeriiakim@ispms.ru

Abstract. *The paper presents the study of the stress state in the system "bone–implant" under static loading due to screw fastening. The relevance of this topic is due to the wide application of implants in orthopedic and dental practice, where it is important to ensure reliable interaction between the implant and surrounding tissues.*

Key words: *mathematical modeling, facial bones, custom implants, stress, finite-element method.*

Введение

Травмы и заболевания костей челюстно-лицевой области представляют собой одни из самых сложных в лечении, поскольку они связаны с жизненно важными органами головы и шеи. При наличии значительных костных дефектов возникает необходимость замены утраченных участков с помощью имплантатов. Поражение костей лица приводит не только к функциональным нарушениям, но и к социальным проблемам, поскольку кости лица выполняют также эстетическую функцию. Поэтому для восстановления как функций, так и эстетики челюстно-лицевой области наиболее подходящими являются индивидуальные имплантаты. Процесс проектирования таких имплантатов, планирования операций и выбора соответствующих материалов для эндопротезирования требует проведения математического моделирования. Целью данной работы является моделирование напряженного состояния части лицевой кости и импланта при креплении винтами.

Экспериментальная часть

Моделирование было выполнено с помощью метода конечных элементов в программном комплексе ABAQUS. При решении задачи были выбраны 3D модели кости, построенной по КТ пациента и индивидуального имплантата. Ввиду недостатков трехмерных моделей такой конфигурации, основанных на КТ, возникли сложности с построением расчетной сетки и трудности при решении контактной задачи. Для достижения сходимости расчетов и их оптимизации был проведен подбор параметров описания контактного взаимодействия [1].

Задание параметров контактного взаимодействия оказывает значительное влияние на сходимость и длительность решения задачи. Для решения задачи была выбрана формулировка контактного взаимодействия «поверхность–поверхность» (Surface-to-Surface), поскольку явно выделяются две контактирующие поверхности. При задании свойств контакта между винтами, имплантатом и участками кости было задано трение для

определения соотношения между нормальными и сдвиговыми силами, передаваемыми через контактирующие поверхности и давление в нормальном направлении.

Особое внимание было уделено учету влияния параметров «давление–зазор» (pressure–closure) на сходимость расчетов и количество итераций.

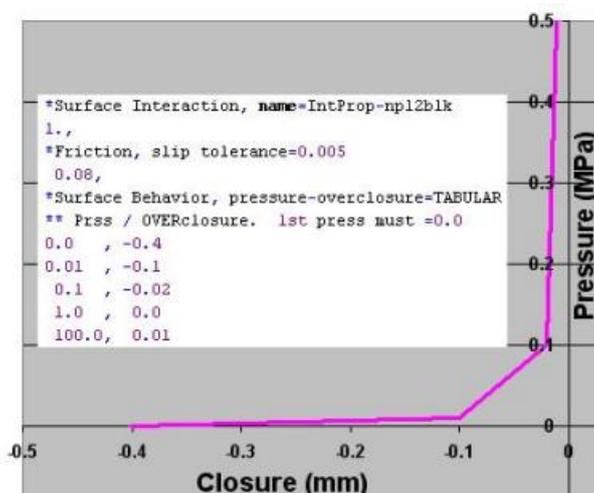


Рис. 1. Зависимость параметров «давление–зазор»

Зависимость «давление–зазор» проиллюстрирована на рис. 1. Наличие крайне низкого давления при больших зазорах указывает на то, что контакты были активны с самого начала анализа, но с минимальными нагрузками. Это обеспечило необходимую стабильность на этапе начального смыкания с небольшими усилиями.

В результате проведения тестовых расчетов, были выбраны значения параметров, обеспечивающие сходимость при наименьшем количестве итераций. Они были использованы для дальнейших расчетов.

Значения упругих характеристик для пористой керамики и костной ткани [2] приведены в таблице 1.

Таблица 1

Механические свойства кости и керамического имплантата

Название	Модуль Юнга, ГПа	Коэффициент Пуассона
Костная ткань	7	0,28
Керамика (ZrO ₂ –Al ₂ O ₃)	9	0,25

На первых двух этапах моделирования напряженного состояния системы «кость–имплантат» были использованы доли лицевой кости разных размеров: на первом этапе был использован фрагмент кости, примыкающий к латеральной части имплантата, на втором этапе половина лицевой кости. На третьем этапе к кости и имплантату были добавлены винты в качестве крепления (рис. 2). Для более точного учета сложной формы моделей и обеспечения точности расчетов были использованы тетраэдральные элементы. Количество конечных элементов в расчетной сетке для кости составило 91855, в имплантате с отверстиями – 150631. На третьем этапе моделирования были добавлены крепежные элементы и отверстия в моделях кости и имплантата. Создание отверстий в моделях сложной конфигурацию вызвало дополнительные проблемы при создании расчетной сетки. Для успешного построения сетки были предприняты шаги по устранению ошибок в твердотельной модели согласно документации ABAQUS.

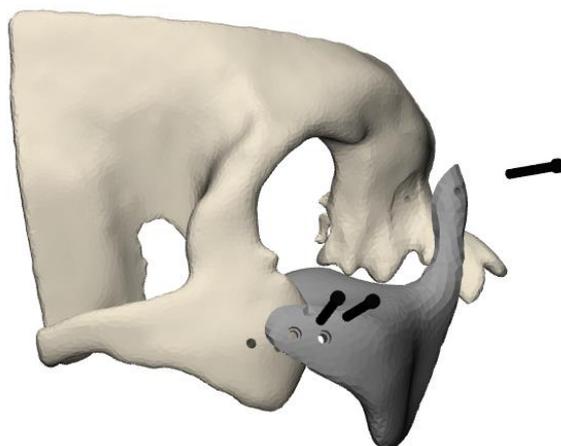


Рис. 2. Разнесенная схема «кость–имплантат» с винтами

Результаты

Анализ распределения интенсивности напряжений показал, что увеличение напряжений наблюдается в области соединения имплантата с костью. Это указывает на то, что данная зона наиболее подвержена концентрации напряжений при нагружении. Такой подход обеспечил получение более реалистичных результатов, отражающих поведение системы в условиях статического нагружения, вызванного креплением имплантата к кости.

Заключение

Выполнен расчет напряженного состояния системы «кость–имплантат» при креплении имплантата к кости с помощью винтов. Анализ распределения напряжений, проведенный на основе моделирования, показал, что в зонах соединения имплантата с костью наблюдается концентрация напряжений как в самом имплантате, так и в костной ткани. При этом максимальный уровень интенсивности напряжений без использования винтов оказался ниже, чем при их наличии, причем в последнем случае концентрации напряжений проявляются более ярко.

Практическая значимость данного исследования заключается в применении моделей лицевых костей черепа и индивидуального имплантата, созданных на основе антропометрических данных конкретного пациента. Результаты анализа напряженного состояния системы «кость–имплантат» могут быть полезны при разработке аналогичных имплантатов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИФПМ СО РАН, тема номер FWRW-2022-0003.

Список литературы

1. Tyrrell R.J. Getting bodies into contact – the despair and joy [Электронный ресурс] // Advanced Analysis Ltd. Engineering Problem Solving through Simulation. – 2011. – URL: https://advancedanalysis.co.uk/AAL/Web_Files/docs/AAL-Getting%20Bodies%20into%20Contact%20-%20the%20Despair%20and%20Joy.pdf (дата обращения 10.02.2024).

2. Сенькина Е.И., Бужков А.С., Ложкомоев А.С. Влияние размера и формы порообразователя на физико-механические свойства циркониевой керамики // Физическая мезомеханика материалов. Физические принципы формирования многоуровневой структуры и механизмы нелинейного поведения : Тезисы докладов Международной конференции, Томск, 05–08 сентября 2022 года. – Новосибирск: НГУ, 2022. – С. 195–196.

УДК 628.9

Спектральные характеристики освещения и их влияние на когнитивные функции студентов

В.А. Колесникова

Научный руководитель: доцент, к.т.н. С.Б. Туранов
Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050

E-mail: vak134@tpu.ru

Spectral characteristics of lighting and their impact on students' cognitive functions

V.A. Kolesnikova

Scientific Supervisor: Ass. Prof., Ph.D. S.B. Turanov
Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050

E-mail: vak134@tpu.ru

Abstract. *This study examines the effects of red, green, and blue light on cognitive performance, attention, and physiological responses. An adaptive RGB lighting system was developed to dynamically adjust color and intensity. Results show that red light boosts physical activity but may cause fatigue, green light enhances relaxation and cognitive perception, and blue light improves alertness and concentration. Adaptive lighting systems could optimize learning environments by aligning with students' biological rhythms, enhancing academic performance and well-being. Further research is needed to refine algorithms and assess long-term cognitive effects.*

Key words: *spectral characteristics, cognitive functions, emotional state, adaptive lighting, educational environment, biodynamic lighting systems.*

Введение

Искусственное освещение играет ключевую роль в когнитивных функциях, эмоциональном состоянии и физиологических процессах. Исследования подтверждают, что спектральные характеристики света, включая интенсивность и цветовую температуру, существенно влияют на циркадные ритмы, уровень бодрствования и нейрофизиологические реакции [1]. В образовательных учреждениях длительное пребывание при неподходящем освещении может снижать концентрацию, ухудшать настроение и повышать утомляемость, что негативно сказывается на учебной продуктивности [2].

Цель исследования – изучить влияние различных спектров света (красного, зелёного и синего) на когнитивные функции, эмоциональное состояние и физиологические реакции студентов.

Экспериментальная часть

Для проведения исследования было разработано интеллектуальное RGB-осветительное устройство (рис. 1), позволяющее регулировать цвет и интенсивность света. Источником света служила светодиодная лента, содержащая светодиоды с длинами волн: красный (625 нм), зелёный (525 нм), синий (470 нм). Управление осуществлялось с помощью контроллера SMART-K22-MIX, а спектральные характеристики освещения измерялись фликер-спектрофотометром PST-SVM OHSP350LFA.

Методы оценки когнитивных функций и физиологических реакций

В исследовании участвовали 3 студента, которым предлагались задания на внимание, восприятие и скорость реакции при различных цветовых режимах освещения. Для объективной оценки физиологических реакций использовались:

Нагрудный пульсометр – для измерения частоты сердечных сокращений;

NASA-TLX (Task Load Index) – для оценки субъективной умственной нагрузки;

Каролинская шкала сонливости – для определения уровня бодрствования;

Шкала визуального утомления (VF) – для оценки зрительной усталости.

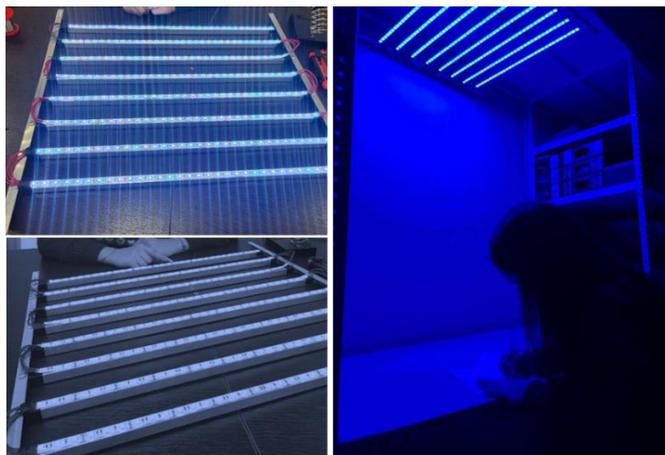


Рис. 1. Осветительный прибор и рабочее место

Результаты

В исследовании участвовали студенты, которым предлагались задания на оценку когнитивных функций: тест слежения (тест № 1 и 2, разной сложности), тест символьных цифр (тест № 3) и тест на различия (тест № 4). Анализ собранных данных показал (рис. 2), что различные спектры света оказывают специфическое влияние на когнитивные функции и эмоциональное состояние:

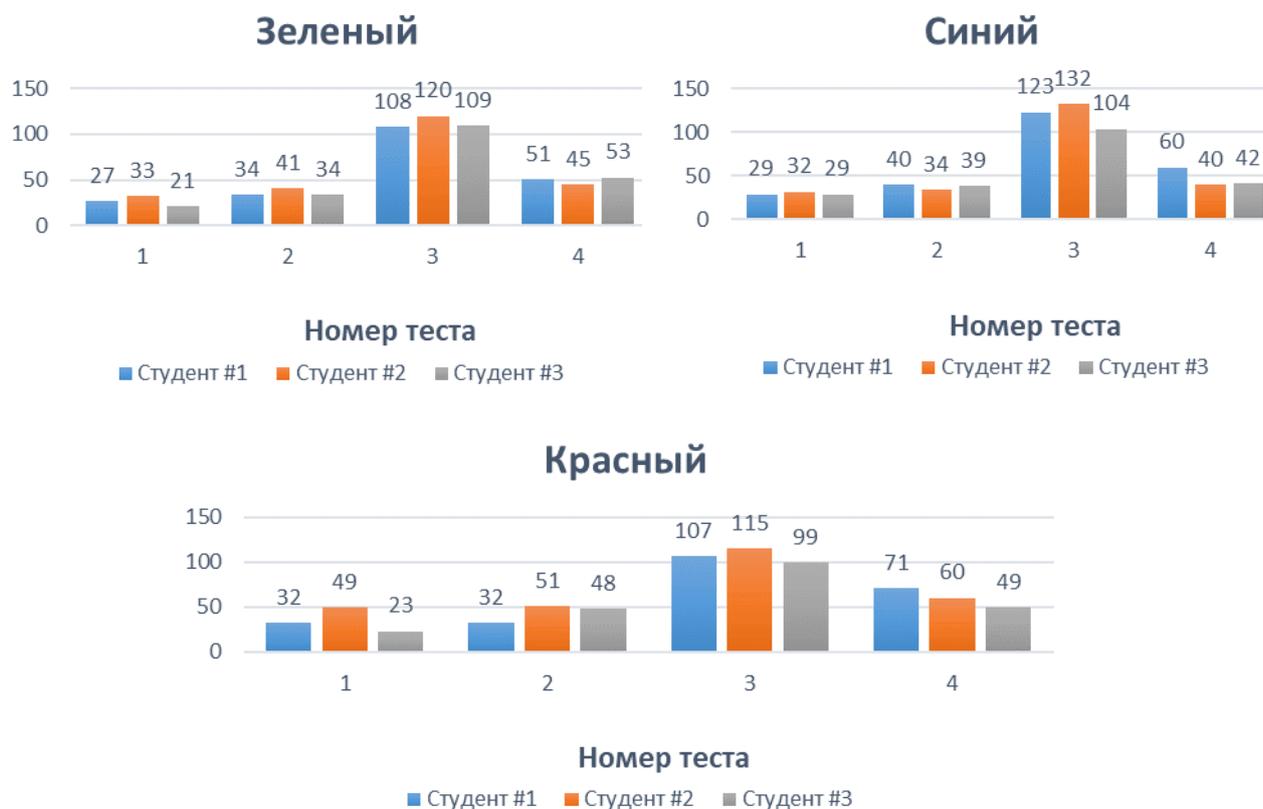


Рис. 2. Гистограммы результатов участника эксперимента

Анализ данных показал, что участники с более высоким пульсом независимо от цвета света тратили больше времени на выполнение тестов, что может указывать на замедленную обработку информации и повышенную когнитивную нагрузку. Прямая связь ЧСС с цветом освещения не выявлена, но наблюдались определенные корреляции.

Красный свет (625 нм) стимулирует физическую активность и мозговую деятельность, но при длительном воздействии увеличивает утомляемость и стресс. Зелёный (525 нм) снижает стресс и улучшает когнитивное восприятие. Синий (470 нм) повышает концентрацию и скорость реакции, но может вызывать зрительное утомление.

Результаты подтверждают значимость спектральных характеристик света в образовательной среде и перспективность адаптивных систем освещения для повышения продуктивности обучения.

Заключение

Разработанная система адаптивного освещения позволила выявить особенности влияния различных спектров света на когнитивные функции студентов. Красный свет стимулирует активность, но способствует утомляемости, зелёный способствует релаксации и улучшению восприятия, а синий повышает концентрацию, но может вызывать зрительное напряжение. При этом красный и синий свет могут вызывать легкое напряжение, что приводит к более длительному выполнению задач.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке интеллектуальных систем биодинамического освещения для образовательных учреждений, учитывающих биоритмы студентов. В дальнейшем требуется проведение дополнительных исследований для оптимизации алгоритмов адаптивного освещения и оценки долгосрочных эффектов на когнитивное здоровье учащихся.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-28-20162, <https://rscf.ru/project/25-28-20162/>.

Список литературы

1. Дейнего В.Н., Капцов В.А. Свет энергосберегающих и светодиодных ламп и здоровье человека. Гигиена и санитария. [Электронный ресурс]. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/svet-energoberegayuschih-i-svetodiodnyh-lamp-i-zdorovie-cheloveka> (дата обращения 12.11.2024).
2. Шаракшанэ А. Влияние освещения на циркадный ритм человека, «опасность синего света» [Электронный ресурс]. – URL: <https://led-e.ru/wp-content/uploads/1852.pdf> (дата обращения 12.11.2024).

УДК: 618.19-006.6:615.28:575.113

Изменение генетического ландшафта опухоли молочной железы под действием различных схем неoadъювантной химиотерапииЕ.А. Кравцова, А.К. Шагабудинова, К.А. Гаптулбарова

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

Томский национальный исследовательский медицинский центр, НИИ онкологии

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

E-mail: zdereva.e@gmail.com**Changes in the genetic landscape of breast tumors under different neoadjuvant chemotherapy regimens**E.A. Kravtsova, A.K. Shagabudinova, K.A. Gaptulbarova

Scientific Supervisor: Ph.D. M.K. Ibragimova

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

E-mail: zdereva.e@gmail.com

Abstract. Breast cancer (BC) occupies a leading place in the structure of oncological morbidity. When developing breast cancer treatment tactics, 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 in order to improve treatment outcomes. To this end, it is necessary to study the effects of various preoperative treatment regimens on the genetic landscape of the tumor, which determines both a favorable outcome and the stimulation of metastasis.

Key words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, genetic landscape of the tumor, personalized treatment, hematogenous metastasis.

Введение

На сегодняшний день золотого стандарта лечения первой линии для пациентов с HER2-отрицательным раком молочной железы (РМЖ) не существует. Именно поэтому необходимо не только выявить пациентов, которым химиотерапия может принести наибольшую пользу, но и использовать системный режим, который имеет максимально возможный краткосрочный терапевтический индекс в сочетании с минимальным риском долговременной значительной токсичности, связанной с лечением. Таким образом целью работы является изучение изменения генетического ландшафта опухоли молочной железы люминального В HER2-отрицательного подтипа под действием различных схем неoadъювантной химиотерапии для выявления предиктивных маркеров объективного ответа на применяемое лечение и прогностических маркеров возникновения гематогенного метастазирования.

Экспериментальная часть

В исследование было включено 63 женщины с морфологически верифицированным диагнозом люминальный В HER2-отрицательный РМЖ (IIA–IIIB стадии), в возрасте от 24 до 68 лет, получавших 4-8 курсов НХТ. В зависимости от применяемых схем предоперационной химиотерапии исследуемая выборка пациенток была разделена на 2 группы: первой группе больных в режиме предоперационной химиотерапии применяли антрациклин-содержащие схемы (FAC/AC, CAH) (n = 35), второй группе в режиме предоперационной химиотерапии применяли таксан-содержащие схемы (ACT/AT, таксотер в моно-режиме) (n = 28). В качестве исследуемого материала, были использованы биопсийные опухолевые образцы (~ 10 мм³), взятые до лечения под контролем УЗИ, а также операционный материал (~ 60–70 мм³) после НХТ. Для анализа aberrаций 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

Для 1-й группы пациенток, которым в режиме предоперационной химиотерапии применяли антрациклин-содержащие схемы неoadъювантной химиотерапии (НХТ), 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 выяснили, что возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве амплификаций в 9p22.2 регионе (0 % до лечения/38,5 % после НХТ) ($p = 0,00229$). Также установлено, что возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве делеций в 9p21.3 регионе (0 % до лечения/23,1 % после НХТ) ($p = 0,053$) (рис. 1).

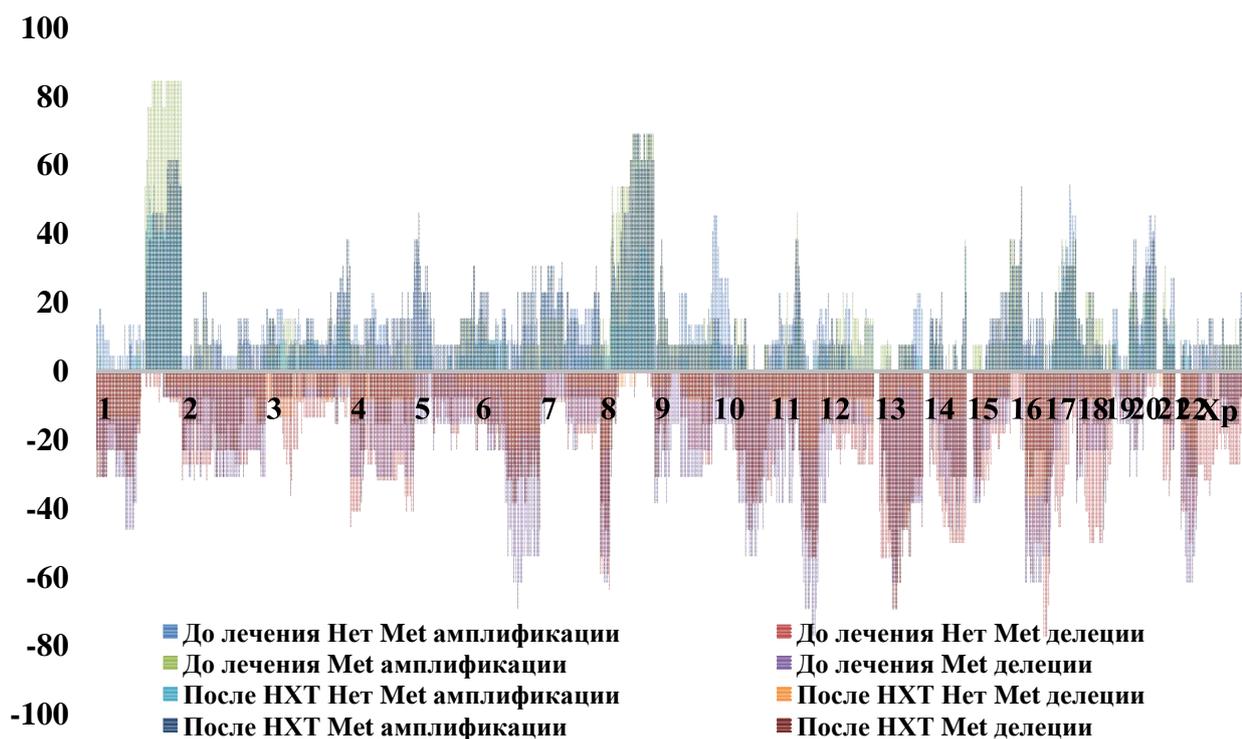


Рис. 1. Частота встречаемости CNA у больных РМЖ, которым в режиме предоперационной химиотерапии были применены антрациклин-содержащие схемы (FAC/AC, CAH), до и после лечения в зависимости от наличия гематогенного метастазирования

Примечание: Нет Met – отсутствие гематогенного метастазирования; Met – наличие гематогенного метастазирования

Потенциально данные локусы могут выступать в качестве прогностического маркера возникновения гематогенного метастазирования у больных люминальным В подтипом РМЖ при назначении антрациклин-содержащих схем НХТ.

Для 2-й группы пациенток, которым в режиме предоперационной химиотерапии применяли таксан-содержащие схемы НХТ, также был проведен анализ распределения частот CNA в группах пациенток до и после лечения в зависимости от наличия гематогенного метастазирования. В исследуемой группе у 7 пациенток зарегистрировано возникновение гематогенного метастазирования.

В результате сравнения частот встречаемости CNA в данных группах пациенток до лечения показано, что возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве амплификаций в 2p13.2 регионе ($p=0,051$) и делеций в 5p13.2 регионе ($p = 0,053$).

В результате сравнения частот встречаемости CNA в данных группах пациенток после лечения показано, что возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве амплификаций в 20q13.33 регионе (0 % до лечения/57,1 % после НХТ) ($p = 0,00171$) (рис. 2).

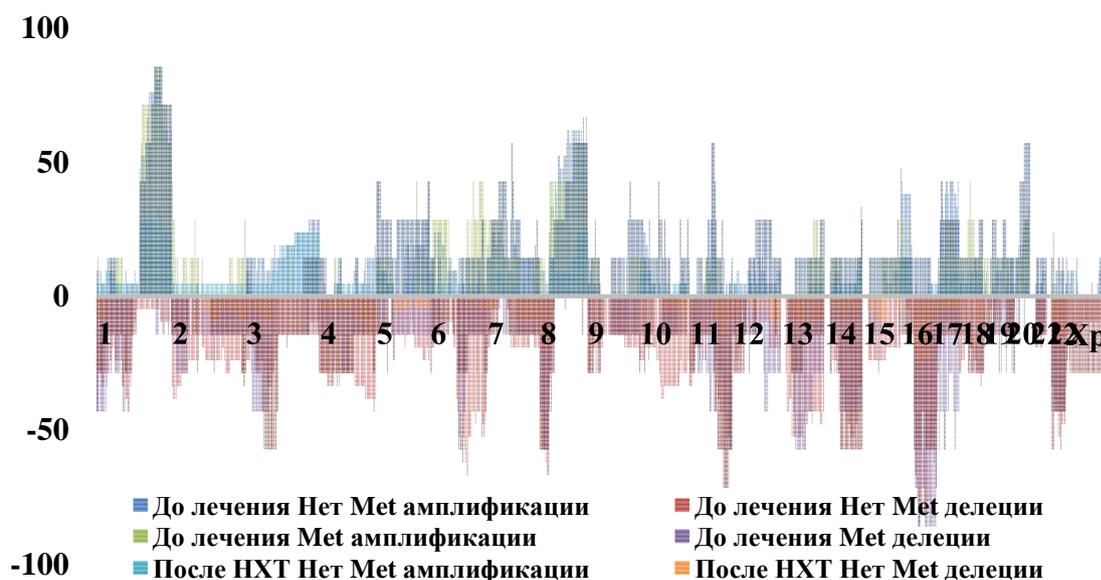


Рис. 2. Частота встречаемости CNA у больных РМЖ, которым в режиме предоперационной химиотерапии были применены таксан-содержащие схемы (ACT/AT, таксотер в моно-режиме), до и после лечения в зависимости от наличия гематогенного метастазирования

Примечание: Нет Met – отсутствие гематогенного метастазирования; Met – наличие гематогенного метастазирования

Потенциально данный локус может выступать в качестве прогностического маркера возникновения гематогенного метастазирования у больных люминальным В HER2-негативным подтипом РМЖ при назначении таксан-содержащие схемы (ACT/AT, таксотер в моно-режиме) НХТ.

Заключение

В ходе выполнения представленного исследования были выявлены потенциальные прогностические маркеры возникновения гематогенного метастазирования для люминального В HER2-отрицательного РМЖ при применении различных схем неоадьювантной химиотерапии.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-25-00499.

УДК 612 821 2

Пространственно-временные характеристики ЭЭГ в процессе решения вербальных задач в контроле и при действии одорантов

Ю.Л. Кундупьян

Научный руководитель: к.б.н. Е.К. Айдаркин

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского
Россия, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, 344090

E-mail: ylkundupyan@sfedu.ru

Spatiotemporal characteristics of the EEG in the process of solving verbal problems in control and under the influence of odorants

I.L. Kundupyan

Scientific Supervisor: Ph.D. E.K. Aydarkin

Southern Federal University, I.D. Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnology, Russia,
Rostov-on-Don, st. Stachki, 194/1, 344090

E-mail: ylkundupyan@sfedu.ru

Abstract. *Interhemispheric relationships can affect memory, attention, efficiency and quality of activity during the solving of verbal and non-verbal tasks, as well as EEG patterns. The individual features of the background EEG rhythms reflect the regulatory processes that provide the coordination of intracortical relationships, affecting the overall state of the brain. However, there are conflicting data about the interhemispheric relationships during solving verbal tasks.*

Key words: *coherence, EEG, odorants, verbal tasks, working memory, attention.*

Введение

Межполушарные отношения, возникающие в процессе выполнения вербальных и невербальных задач, могут влиять на память, внимание, эффективность деятельности, а также на паттерны ЭЭГ. Индивидуальные особенности фоновых ритмов ЭЭГ отражают характер регуляторных процессов, обеспечивающих координацию внутри-корковых взаимоотношений, влияя на общее состояние мозга. Однако существуют противоречивые данные о характере межполушарных отношений при решении вербальных задач. Обонятельный анализатор тесно связан со структурами головного мозга, имеющими непосредственное отношение к механизмам памяти и эмоций [1].

Целью нашего исследования было изучение уровня пространственно-временных характеристик ЭЭГ при решении вербальных задач в контроле и присутствии одорантов разной направленности.

Экспериментальная часть

В исследовании принимали участие 38 практически здоровых обследуемых, в возрасте от 18 до 26 лет. В качестве модели деятельности использовали вербальные задачи. Каждый обследуемый должен был проанализировать 100 слайдов, исключая неподходящее по смыслу слово на слайде в контроле и в присутствии одорантов розмарина, мелиссы и лаванды. Запах предъявлялся открытым способом на расстоянии 2 см от кончика носа. Во время выполнения теста регистрировали ЭЭГ. Оцифрованная ЭЭГ экспортировалась в программную среду Python, где проводилась дальнейшая обработка сигналов. Уровень когерентности анализировали в диапазоне дельта-, тета-, альфа-, бета1-, бета2- ритмов во всех исследуемых состояниях.

Результаты

Результаты исследования продемонстрировали, что воздействие всех исследуемых одорантов (лаванда, розмарин, мелисса) оказывает положительное влияние на эффективность

деятельности, выражающееся в сокращении времени решения вербальных задач. В частности, в группе лаванды наблюдалось статистически значимое ускорение времени решения (3,25 с) по сравнению с контрольной группой (3,9 с) ($p < 0.05$). Анализ уровня КОГ в диапазоне дельта-ритма показал, что воздействие розмарина и мелиссы приводило к увеличению межполушарной когерентности (КОГ) в лобных отведениях, что может отражать процессы, связанные с произвольной памятью и семантическим анализом стимула [2]. Розмарин также усиливал КОГ в лобно-височных и височно-затылочных отведениях правого полушария и снижал межполушарную КОГ в центральных отведениях. Лаванда увеличивала межполушарную КОГ в височных отведениях, а также КОГ в лобно-центральных и височно-теменных отведениях, что интерпретируется как отражение процессов осмысления образов из долговременной памяти, протекающих относительно независимо [3].

Анализ пространственно-временных характеристик в диапазоне тета-ритм показал, что розмарин и мелисса вызывали увеличение межполушарной КОГ в лобных и лобно-височных отведениях правого полушария, что было связано с активацией процедурной памяти, внимания, а также с вовлечением управляющего компонента рабочей памяти в регуляцию когнитивных процессов [4]. В условиях действия лаванды наблюдалось симметричное повышение КОГ в лобно-височных и лобно-центральных отведениях правого полушария и снижение межполушарной КОГ в центральных, височных и теменных областях, что может отражать деятельность кортико-гиппокампальной и фронто-таламической систем интеграции мозговой активности [5]. Динамика уровня пространственно-временных характеристик ЭЭГ в диапазоне альфа-ритма показала, что розмарин и мелисса вызывали снижение КОГ в височных, центральных и теменных отведениях левого полушария, что согласуется с ролью альфа-ритма как индикатора скрытого внимания [6]. Данная десинхронизация может отражать процессы, связанные с восприятием, оценкой и памятью [7].

Лаванда значительно снижала межполушарную КОГ в височных и лобно-височных отведениях обоих полушарий, что может указывать на активацию эпизодической памяти и вовлечение гиппокампа в когнитивные процессы [8]. Пространственно-временные характеристики ЭЭГ в диапазоне бета1-ритма в присутствии одорантов розмарина и мелиссы вызывали снижение КОГ в центральных, височных и теменных отведениях левого полушария. Лаванда повышала КОГ в центральных отведениях и снижала в центрально-височных отведениях левого полушария и в височно-затылочных областях правого полушария, что может свидетельствовать о продуктивном запоминании информации [9]. Уровень внутриполушарной КОГ бета2-ритма при действии розмарина значительно увеличивался в лобно-височных и височно-теменных отведениях левого полушария, а уровень межполушарной КОГ в затылочных и височных отведениях, что может свидетельствовать о вербально-логическом мышлении [10]. При действии мелиссы происходило увеличение межполушарной КОГ в лобных отведениях и в лобно-затылочных отведениях левого полушария, что может быть связано с активацией лексико-семантических представлений. При действии лаванды происходило значительное снижение КОГ в лобно-затылочных отведениях правого полушария [11].

Заключение

Таким образом, результаты демонстрируют дифференцированное влияние одорантов розмарина, мелиссы и лаванды на пространственно-временную организацию ЭЭГ, отражающее вовлечение различных когнитивных процессов, включая память, внимание и семантическую обработку информации. Лаванда демонстрирует улучшение эффективности деятельности и вербальной рабочей памяти. Розмарин оказывает положительное влияние на семантическую обработку. Мелисса способствует усилению избирательного внимания к языковым стимулам. Каждый из исследованных одорантов оказывает специфическое

воздействие на нейрофизиологические механизмы, лежащие в основе различных аспектов вербального познания.

Список литературы

1. Zhou G., Olofsson J. K., Koubeissi M.Z., Menelaou G., Rosenow J., Schuele S.U., Xu P., Voss J.L., Lane G., Zelano C. Human hippocampal connectivity is stronger in olfaction than other sensory systems // *Progress in neurobiology*. – 2021. – Vol. 201. – P. 102027.
 2. Ребрейкина А.Б., Ларионова Е.В., Варламов А.А. Вызванные изменения ритмической активности мозга при переработке зрительно предъявляемых целевых, нецелевых и незнакомых слов // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. – 2015. – Т. 65, № 1. – С. 92–92.
 3. Карпова В.В., Дикая Л.А. Особенности функциональных связей коры мозга у испытуемых с разным уровнем продуктивности образной творческой деятельности // *Северо-Кавказский психологический вестник*. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 42–46.
 4. Мачинская Р.И. и др. Корково-корковое функциональное взаимодействие при удержании эмоционально окрашенных изображений в рабочей памяти. Анализ когерентности тета-ритма ЭЭГ в пространстве источников // *Физиология человека*. – 2016. – Т. 42, № 3. – С. 56–73.
 5. Костандов Э.А., Черемушкин Е.А. Вызванная реакция синхронизации/десинхронизации корковой электрической активности тета-и альфа-диапазонов на изображение лица при увеличении нагрузки на рабочую память // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. – 2011. – Т. 61, № 1. – С. 35–46.
 6. Cohen L. et al. Language-specific tuning of visual cortex? Functional properties of the Visual Word Form Area // *Brain*. – 2002. – Vol. 125, № 5. – P. 1054–1069.
 7. Krause C.M., Sillanmäki L., Koivisto M., Häggqvist A., Saarela C., Revonsuo A., Laine M., Hämäläinen H. Effects of electromagnetic fields emitted by cellular phones on the electroencephalogram during a visual working memory task // *International Journal of Radiation Biology*. – 2000. – Vol. 76, № 12. – P. 1659–1667.
 8. Pesonen M., Hämäläinen H., Krause C.M. Brain oscillatory 4–30 Hz responses during a visual n-back memory task with varying memory load // *Brain research*. – 2007. – Vol. 1138. – P. 171–177.
 9. Лукоянов М.В., Крылов В.Н. Когерентность ЭЭГ при пассивном восприятии линий с различным углом наклона у левшей и правшей // *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. – 2012. – № 5–1. – С. 135–139.
 10. Джебрайлова Т.Д., Коробейникова И.И. Пространственная организация бета2-ритма ЭЭГ и эффективность когнитивной деятельности человека // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. – 2013. – Т. 63, № 6. – С. 667–667.
- ковенко И.А., Козлов М.К., Черемушкин Е.А. Изменения вызванного бета-ритма в коре больших полушарий при формировании установки на эмоциональное выражение лица в условиях нагрузки на рабочую память // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. – 2012. – Т. 62, № 3. – С. 302–302.

УДК 616-092

Исследование предикторов тромбоза при гиперкоагуляционном синдроме**А.И. Курганникова¹, П.Е. Никифоров²**

Научные руководители: профессор, д.ф.-м.н. В.П. Демкин, к.м.н. Е.П. Федорова

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

²Томский национальный исследовательский медицинский центр, НИИ фармакологии

и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга

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

E-mail: bombomulala@mail.ru**Investigation of predictors of thrombosis in hypercoagulation syndrome****A.I. Kurgannikova¹, P.E. Nikiforov²**

Scientific Supervisors: Prof., Dr. V.P. Demkin, Ph.D. E.P. Fedorova

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina str., 36, 634050²Tomsk National Research Medical Center, E.D. Goldberg RI of Pharmacology and Regenerative Medicine

Russia, Tomsk, Lenin str., 3, 634028

E-mail: bombomulala@mail.ru

Abstract. *In this study, we conducted experimental modeling of hypercoagulation syndrome and evaluated the dynamics of peripheral blood parameters, which significantly increase the likelihood of its occurrence and development of thrombosis. A statistically significant increase in the number of leukocytes, erythrocytes, hemoglobin, and hematocrit was recorded on the final day of the experiment in laboratory animals (rats) 29 %, 13 %, 6 %, 6 % accordingly, it is higher than the indicators of the control group. It has been shown that for a better study of hypercoagulation in patients, it is necessary to conduct a laboratory study of 12 major significant peripheral blood parameters that can act as predictors of thrombosis.*

Key words: *hypercoagulation syndrome, hypercoagulation, platelets, erythrocytes, generalized pulmonary thrombosis model, thromboplastin.*

Введение

В последние десятилетия гиперкоагуляционный синдром (ГКС) стал предметом повышенного интереса со стороны научного сообщества и медицинских специалистов, как патология, связанная с высоким риском тромбообразования. К развитию ГКС предрасположены около 5 % внешне здоровых людей, с возрастом (65–80 лет и старше) ГКС выявляют у 70–85 % лиц. Возникшие при ГКС тромбоэмболические осложнения в 35–45 % случаев являются причиной летального исхода пациентов [1]. Известно, что выраженные изменения микроциркуляции и системы гемостаза при ГКС во многом определяются физическими свойствами тромбоцитов и эритроцитов [2]. С изменением свойств меняется функциональная активность клеток, что приводит к формированию эритроцитарных и тромбоцитарных агрегатов [3]. Специфическое клиническое проявление и затруднительное исследование тромбоэмболических осложнений, увеличивают значимость лабораторной диагностики и поиск показателей – биомаркеров, среди которых особое внимание уделяется именно параметрам периферической крови.

Экспериментальная часть

В нашем исследовании ГКС моделировали на основе тромбопластин-индуцированной модели, показавшей хорошую воспроизводимость венозного тромбоза и позволяющей в реальном времени наблюдать и изучать процессы тромбообразования [4, 5].

Эксперименты проведены на 80 крысах-самках стока SD массой 200–250 г. из питомника НИИФиРМ им Е.Д. Гольдберга, разделенных на 2 группы: контрольная группа (n = 40), экспериментальная группа (n = 40). Для определения оптимальной дозы был проведен пробит-анализ. Для моделирования ГКС крысам в хвостовую вену внутривенно вводили 3 % раствор тромбопластина в объеме 300 мкл. Забор крови проводился на 1, 3, 5, 7, 10, 14, 17, 21 сутки.

Динамику 12 гематологических показателей оценивали с помощью автоматического гематологического анализатора 5-diff Mindray BC-5000Vet (табл. 1). Статистический анализ проводился программой StatPlus версии 7.6.5. 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 %.

Таблица 1

*Изменение гематологических показателей при развитии гиперкоагуляции
у лабораторных животных (крысы)*

	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCH C	RDW	PLT	MPV	PDW	PCT
конт- роль	13,30 ± 0,64	8,75 ± 0,13	18,84 ± 0,24	46,92 ± 0,48	53,38 ± 0,48	21,50 ± 0,18	40,50 ± 0,18	25,44 ± 0,33	763,20 ± 28,80	5,22 ± 0,12	15,54 ± 0,50	4,19 ± 0,23
1 сут	17,06 ± 0,86*	9,26 ± 0,23	18,92 ± 0,42	42,44 ± 0,85*	45,86 ± 0,50*	20,44 ± 0,17*	44,58 ± 0,24*	23,44 ± 0,41*	632,00 ± 41,22	4,92 ± 0,06	24,06 ± 2,06*	3,10 ± 0,17*
3 сут	16,24 ± 0,76*	9,53 ± 0,08*	19,72 ± 0,13*	48,18 ± 0,77	51,48 ± 0,20*	20,92 ± 0,15*	40,48 ± 0,17	25,36 ± 0,38	749,40 ± 15,75	5,32 ± 0,04	17,62 ± 0,21*	4,00 ± 0,10
5 сут	16,45 ± 0,63*	8,80 ± 0,26	18,62 ± 0,53	47,34 ± 1,09	52,60 ± 0,45	20,22 ± 0,29*	38,38 ± 0,27*	23,92 ± 0,26*	899,60 ± 41,41*	6,04 ± 0,09*	15,30 ± 0,10	4,82 ± 0,26
7 сут	16,30 ± 1,27*	8,74 ± 0,12	17,78 ± 0,15*	46,44 ± 0,45	53,32 ± 0,52	20,36 ± 0,24*	38,22 ± 0,37*	25,40 ± 0,70	877,60 ± 18,15*	6,32 ± 0,04*	15,58 ± 0,04	5,55 ± 0,19*
10 сут	13,96 ± 0,59	8,80 ± 0,27	18,40 ± 0,46	47,42 ± 1,20	53,94 ± 0,44	20,92 ± 0,16	38,78 ± 0,04*	25,22 ± 0,31	826,40 ± 39,76	6,16 ± 0,05*	15,58 ± 0,07	5,08 ± 0,28
14 сут	17,70 ± 0,50*	8,64 ± 0,28	18,16 ± 0,57	46,92 ± 1,48	54,36 ± 0,37	21,00 ± 0,18	38,66 ± 0,23*	25,18 ± 0,30	864,80 ± 19,64*	6,32 ± 0,04*	15,62 ± 0,05	5,48 ± 0,26*
17 сут	15,34 ± 0,42*	9,11 ± 0,21*	19,20 ± 0,48	46,20 ± 1,18	50,70 ± 0,71*	21,08 ± 0,35	41,54 ± 0,15*	24,16 ± 0,33*	750,60 ± 70,32	5,34 ± 0,11	18,46 ± 0,63*	4,15 ± 0,29
21 сут	17,20 ± 0,50*	9,88 ± 0,2*	20,00 ± 0,28*	49,76 ± 0,68*	51,98 ± 0,66	20,90 ± 0,25	40,22 ± 0,24	25,68 ± 0,23	804,40 ± 32,07	5,10 ± 0,12	17,38 ± 0,68	4,40 ± 0,05

Результаты

Результаты выполненных исследований показали, что введение экспериментальным животным (крысам) 3 % раствора тромбопластина приводило к повышению всех гематологических показателей в экспериментальной группе уже на первые сутки эксперимента. Так, количество лейкоцитов (WBC) на 1-е сутки повысилось на 28 % в сравнении с группой контроля (от 13,30 до 17,06 г/л). Статистически значимое повышение WBC регистрировали на 21-е сутки (17,20 г/л), что на 29 % выше значения контрольной группы и может свидетельствовать о наличии воспалительного процесса в сосудах.

На итоговые сутки эксперимента было зарегистрировано повышение количества эритроцитов (RBC) в крови (с 8,75 до 9,88 т/л), уровня гемоглобина (HGB) (с 18,84 до 20,00 г/дл), что на 12 % и 6 % соответственно выше показателей группы контроля. Данный факт свидетельствует о повышении вязкости крови и ухудшении кровоснабжения.

Об увеличении данного показателя также свидетельствует повышение на 21-е сутки гематокритного числа (HCT) (49,76 %), что на 6 % выше уровня контрольной группы. Следует отметить, что в общей популяции повышение уровня гематокрита на 5 % ассоциировано с увеличением риска венозных тромбозов [6].

Развитие тромбоцитоза в периферической крови регистрировали по изменению количества тромбоцитов (PLT), на 5-е сутки их значение достигло 899,60 т/л, что выше на 18 % превышает показатель контрольной группы. Также наблюдалось повышение уровня тромбокриты (PCT) на 7-е и 14-е сутки, с максимальным изменением данного показателя на 7-е сутки (5,55 %), что на 32 % выше показателя группы контроля.

Таким образом, динамика гематологических показателей свидетельствует о развитии гиперкоагуляционного синдрома, сопровождающегося сгущением крови и высоким риском тромбообразования.

Заключение

Проведено исследование по моделированию ГКС у лабораторных животных (крыс) путем внутривенного введения 3 % раствора тромбопластина в латеральную хвостовую вену.

На основе расчета U-критерия Манна-Уитни было установлено, что статистически значимое влияние на развитие тромбоза оказывают все 12 гематологических показателей периферической крови, расположенных в порядке убывания по их значимости на риск развития ГКС и тромбоза – WBC, MCHC, MCH, MPV, RBC, HGB, MCV, RDW, PLT, PDW, PCT, HCT. Установленный факт свидетельствует о сложных взаимосвязях между различными гематологическими показателями крови, а также многофакторности патогенеза венозного тромбоза.

Список литературы

1. Коломенцев С.В. Дополнительные факторы риска внутригоспитального ишемического инсульта. Гиперкоагуляционный синдром // Известия Российской Военно-медицинской академии. – 2021. – № 4. – С. 87–94.
2. Тихомирова И.А. Реология крови и микроциркуляция // Успехи физиологических наук. – 2023. – Т. 54, № 1. – С. 3–25.
3. Порядин Г.В. Патофизиология системы гемостаза // Методические разработки для самостоятельной работы студентов лечебного и педиатрического факультетов. – 2013. – 39 с.
4. Голубев А.М., Мороз В. В., Лысенко Д. В. и др. Патогенез и морфология острого повреждения легких // Общая реаниматология. – 2005. – Т. 1, № 3. – С. 17–20.
5. Чурин А.А., Фёдорова Е.П., Фомина Т.И. и др. Экспериментальное обоснование применения перорального тромболитика на основе иммобилизованных субтилизинов и антикоагулянта на основе низкомолекулярного гепарина для лечения тромбоза сосудов легких при covid-19 // Бюллетень медицинской науки. – 2022. – Т. 25, № 1. – С. 43–51.
6. Brækkan S.K., Mathiesen E.B., Njølstad I. Hematocrit and risk of venous thromboembolism in a general population // Haematologica. – 2010. – Vol. 95, № 2. – P. 270–275. doi:10.3324/haematol.2009.008417.

УДК 535.8

Изучение пористости никелида титана (NiTi) с использованием оптической когерентной томографии

Т.Б. Лепехина, Г.В. Малкин, В.В. Николаев

Научный руководитель: профессор, д.ф.-м.н. Ю.В. Кистенев

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

E-mail: tatiana_lepekhina@mail.ru

Evaluating the porosity of nickel-titanium (NiTi) using optical coherence tomography

T.B. Lepekhina, G.V. Malkin, V.V. Nikolaev

Scientific Supervisor: Prof., Dr. Y.V. Kistenev

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

E-mail: tatiana_lepekhina@mail.ru

Abstract. *Titanium nickelide (NiTi) has proven to be one of the best biomaterials for implantation. Due to its unique properties, NiTi provides the best biocompatibility with human body tissues. In this study, NiTi samples obtained by self propagating high-temperature synthesis (SHS) and selective laser melting (SLM) were analyzed. The porosity of NiTi was assessed using optical coherence tomography (OCT). The surface of porous NiTi samples was analyzed and the pore surface relative to the entire sample was estimated.*

Key words: *titanium nickelide, porosity, optical coherence tomography, biocompatibility.*

Введение

Увеличение продолжительности жизни и связанные с ним возрастные дегенеративные изменения костных и суставных тканей, а также травмы представляют собой одну из самых важных проблем в области здравоохранения. Это приводит к увеличению спроса на индивидуальные имплантаты, которые помогают восстановить костную ткань. Никелид титана (NiTi) зарекомендовал себя одним из лучших биоматериалов для имплантации. Имплантаты на основе NiTi обладают химической инертностью, эффектом памяти формы и сверхэластичностью, что делает их идеальным материалом для имплантации в ортопедии, стоматологии и кардиологии. NiTi способен адаптироваться к анатомическим особенностям пациента и выдерживать динамические физиологические нагрузки [1]. Развитие данного направления связано с поиском технологий изготовления имплантатов из NiTi с характеристиками, которые бы обеспечивали наилучшую приживаемость в организме человека, что, в первую очередь, связано с их биосовместимостью [2]. Биосовместимость – способность материала интегрироваться с тканями пациента, не вызывая каких-либо побочных клинических реакций. Одним из ключевых факторов, влияющих на биосовместимость биоматериалов, является пористость, которая влияет на выживаемость клеток, обеспечивая пространство для их прикрепления, миграции и роста [3, 4]. Оптимальный размер пор оказывает положительное влияние на пролиферацию и морфологию клеток, повышая биосовместимость биоматериала. Для оценки пористости в настоящее время применяются такие визуально-оптические методы, как оптическая микроскопия и сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Однако недостатками данных методов являются ограниченная глубина фокусировки, специфические требования к подготовке образцов (полировка, шлифовка). Следовательно, поиск эффективных и доступных методов для анализа пористости является актуальной задачей. В данной работе оптическая когерентная томография (ОКТ) выступает альтернативным методом оценки пористости NiTi, так как позволяет управлять пространственным положением области визуализации, что позволяет исследовать поры на заданной глубине [5].

Целью данной работы является применение метода ОКТ для анализа пористости образцов из NiTi, используемого в качестве одного из основных биомедицинских материалов для имплантации.

Экспериментальная часть

Для проведения исследования были использованы образцы NiTi, полученные методами самораспространяющегося высокотемпературного синтеза (СВС) и селективного лазерного плавления (Selective laser melting, SLM). Образцы, полученные методом СВС, представляли собой диски толщиной 6 мм и диаметром 12 мм. Образцы NiTi, полученные методом SLM, имели кубическую форму со сторонами 10 мм. Образцы были подготовлены лабораторией медицинских сплавов и имплантатов с памятью формы Национального исследовательского Томского государственного университета.

Оценка пористости образцов NiTi проводилась с помощью прибора ОКТ GANYMEDE-II (THORLABS, США) с модулем сканирования OCTG-900. Суперлюминесцентный диод с осевым разрешением до 6 мкм и длиной рабочей волны 930 ± 50 нм позволяет получить глубину проникновения светового сигнала до 2,9 мм для оптически прозрачных образцов. При последовательной цифровой обработке данных анализировались изображения на глубине от 200 до 400 мкм. Примеры изображений поверхности образцов NiTi, полученные с помощью ОКТ, представлены на рис. 1.

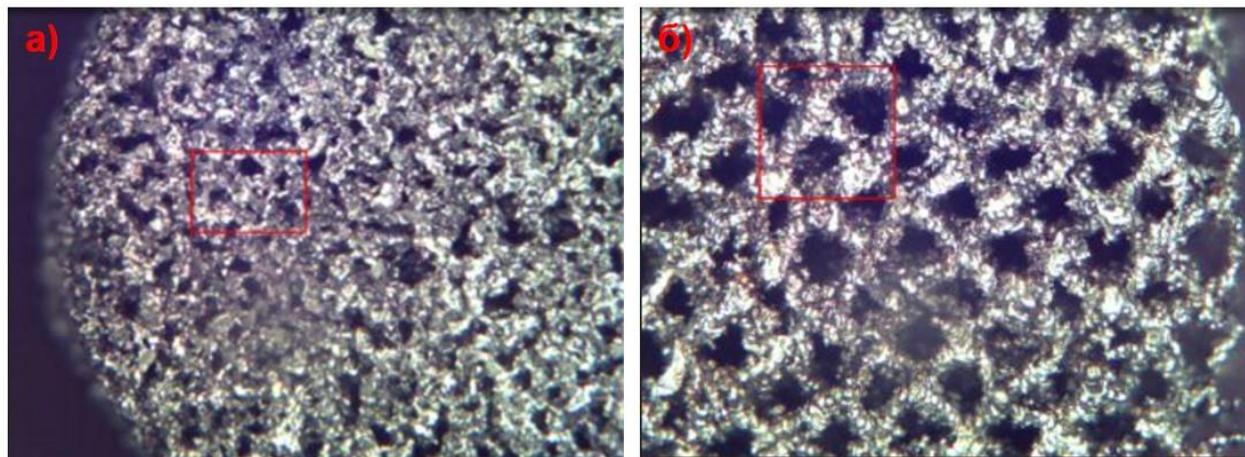


Рис. 1. Примеры поверхности образцов NiTi, полученные: а) методом СВС, б) методом SLM

Всего было измерено 4 образца (по 2 из каждой группы). Для каждого образца было измерено 20 С-сканов из разных неперекрывающихся областей (общее измерение – 80 С-сканов).

Для обработки данных использовалась программа ThorImageOCT 5.0.1. Образцы NiTi были измерены с обеих сторон (сверху и снизу). Измерения были проведены по непересекающимся областям сканирования, выделенных параллельным переносом вдоль осей X, Y. Для каждого образца были получены трехмерные массивы данных (С-сканы) и проведены срезы по осям X, Y и Z, что позволило проанализировать не только поверхностную структуру образцов NiTi, но и глубину, до которой доходят поры. На рис. 2 в качестве примера приведены срезы вдоль осей Y и Z для образца NiTi, полученного методом SLM. Срез по оси Y проходит перпендикулярно поверхности образца и позволяет проанализировать структуру образца сбоку. Срез по оси Z позволяет проанализировать поверхность образца сверху.

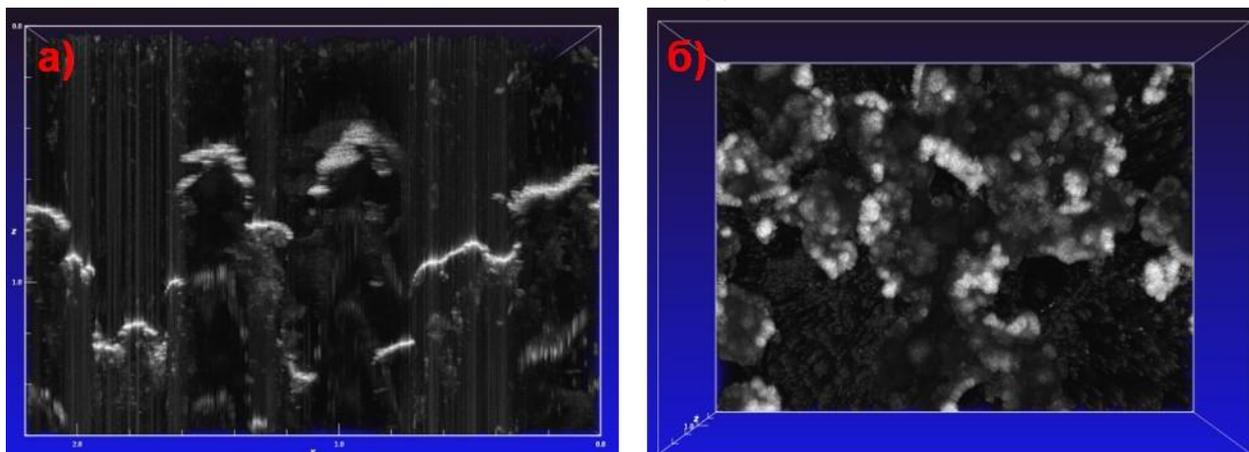


Рис. 2. Примеры ОКТ-изображений образцов NiTi, полученных методом СВС: а) вдоль оси у, б) вдоль оси z

Результаты

В результате применения ОКТ были получены 3D изображения пористого NiTi, изготовленного методами СВС и SLM. Проанализирована поверхность образцов пористого NiTi, оценена площадь пор по отношению к площади всего образца. После обработки данных было обнаружено, что биоматериалы, изготовленные двумя разными методами, могут иметь разные параметры пор, такие как размер пор, их глубина и диаметр.

Заключение

Пористость является одним из важных факторов, который влияет на биосовместимость биомедицинских материалов. В данном исследовании с помощью метода ОКТ удалось проанализировать поверхностную структуру пористого NiTi. Благодаря данному исследованию сделан вывод о том, что имплантаты из NiTi, изготовленные двумя разными методами СВС и SLM, могут отличаться по характеристикам пористости.

Распределение пор по размерам, средний размер пор и их глубина влияют на биосовместимость материалов с тканями организма. Следовательно, важное значение для наилучшей приживаемости имплантата в организме человека имеет не только выбор правильного биоматериала, но и выбор оптимального метода изготовления имплантата.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2024-557 от 25.04.2024 г.)

Список литературы

1. Гюнтер В.Э., Ходоренко В.Н., Ясенчук Ю.Ф. Никелид титана: медицинский материал нового поколения. – Томск : Изд-во МИЦ, 2006. – 296 с.
2. Williams D.F. On the mechanisms of biocompatibility // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29, № 20. – С. 2941–2953.
3. Shishkovsky I.V. et al. Porous biocompatible implants and tissue scaffolds synthesized by selective laser sintering from Ti and NiTi // *Journal of Materials Chemistry*. – 2008. – Vol. 18, № 12. – С. 1309–1317.
4. Hernandez J.L., Woodrow K.A. Medical applications of porous biomaterials: features of porosity and tissue-specific implications for biocompatibility // *Advanced healthcare materials*. – 2022. – Vol. 11, № 9. – С. 2102087.
5. Podoleanu A.Gh. Optical Coherence Tomography // *Journal of Microscopy*. – 2012. – Vol. 247, № 3. – С. 209–219.

УДК 575.174.015.3:599.9

**Анализ плацентоспецифичной экспрессии с альтернативного промотора
ретротранспозона LINE-1****И.В. Лушников, М. А. Жилкина**

Научный руководитель: д.б.н. С.А. Васильев

Томский национальный исследовательский медицинский центр, НИИ медицинской генетики,
Россия, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10, 634050E-mail: ivan.lushnikov@medgenetics.ru**Analysis of placenta-specific expression from an alternative LINE-1 retrotransposon promoter****I.V. Lushnikov, M. A. Zhilkina**

Research Supervisor: Dr. S.A. Vasilyev

Tomsk National Research Medical Center, RI of Medical Genetics, Russia, Tomsk, Ushayka River
Embankment str., 10, 634050E-mail: ivan.lushnikov@medgenetics.ru

Abstract. *The impact of expression from the alternative promoter of the LINE-1 retrotransposon (LINE-1 ASP) on placental development remains poorly understood. In this study, we analyzed human placental transcriptomes (n = 14) using RNA-Seq to identify genes expressed from the LINE-1 ASP. We found that 223 genes exhibited increased expression from the LINE-1 ASP, with some of them (KIF7, ICA1, BMAL2) associated with the function of primary cilia and the Hedgehog signaling pathway, which are critical for placental development. Comparison with lymphocyte transcriptomes (n = 2) revealed 6 transcripts with elevated expression in the placenta, including genes linked to ciliopathies. These results highlight the role of LINE-1 ASP in regulating genes essential for placental formation through mechanisms involving primary cilia, thereby expanding our understanding of epigenetic risk factors for pregnancy pathologies.*

Key words: *LINE-1 retrotransposon, ciliopathy, alternative expression, placenta.*

Введение

Плацента играет ключевую роль в успешном развитии беременности, обеспечивая питание и защиту эмбриона. Известно, что фундаментальную роль в контроле развития плаценты играют эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов [1]. Ретротранспозон LINE-1, составляющий около 17% генома человека, способен к экспрессии не только с основного, но и с альтернативного промотора (LINE-1ASP), однако его роль в формировании и функционировании плаценты остается малоизученной. В данной работе были идентифицированы гены, для которых характерна экспрессия с альтернативного промотора LINE-1 в плаценте.

Экспериментальная часть

Для анализа результатов полнотранскриптомного сиквенса был разработан биоинформатический алгоритм. На первом этапе анализа были идентифицированы гены, содержащие одну или более вставок LINE-1. Список транскриптов, принадлежащих 40 680 генам были получены из базы данных RefSeq NCBI (версия GENCODE V47). Координаты вставок LINE-1 в геноме человека были извлечены из базы данных L1Base GRCh38 (13 418 вставок). С помощью пересечения координат транскриптов генов и вставок LINE-1 был сформирован список из 2863 генов, содержащих вставки LINE-1. Так как направление транскрипции с LINE-1ASP противоположно транскрипции с основного промотора LINE-1 и сходно с направлением транскрипции канонического промотора гена, мы отобрали 2035 генов, направление транскрипции которых противоположно направлению транскрипции LINE-1. Чтобы оценить покрытие экзонов до и после вставки LINE, мы использовали границы экзонов

из датасета GENCODE V47 и разделили их на соответствующие группы. Для анализа экспрессии генов с LINE-1ASP мы использовали общедоступные данные RNA-Seq из 14 транскриптомов плаценты I и II триместра беременности (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser>). Оценка качества прочтений была выполнена с помощью FastQC, после чего был проведен тримминг оставшихся последовательностей адаптеров и низких по качеству прочтений с помощью Trim-Galore. Картирование было сделано на сборку генома версии Release 47 (GRCh38.p14), взятой с GENCODE (<https://www.encodegenes.org/human/>) с помощью программы HISAT2. Для кластеризации экзонов в зависимости от их расположения относительно LINE были определены координаты вставки LINE-1 для каждого гена. Если вставок было несколько, то бралась ближайшая к терминальной части гена. После подсчета покрытия экзонов и их кластеризации для каждой группы рассчитывалось среднее покрытие. Так было получено 12903 транскрипта, принадлежащих 1658 генам.

На 2 этапе анализа было подсчитано количество прочтений, картированных на регион между интроном гена и вставкой LINE-1, расположенных ближе всего к терминальной части гена. Для этого были взяты координаты вставок, далее получен регион затравки длиной 30 нуклеотидов, включающих в себя 15 нуклеотидов интрона и 15 нуклеотидов LINE. С помощью пакета программ Bedtools getfasta были получены последовательности этих регионов. После чего для каждого транскрипта были получены последовательности прочтений, картированные в регион затравки (15 нуклеотидов LINE + 15 нуклеотидов интрона + 10 нуклеотидов в обе стороны). Риды были отфильтрованы так, чтобы 70 % их последовательности совпадало с затравкой. Таким образом, получены прочтения, картированные как на часть интрона, так и на часть вставки LINE. Это необходимо, так как расположенные по всему геному последовательности LINE схожи, и в одном регионе может наблюдаться избыточное покрытие LINE, а в другом оно может отсутствовать. Данное обстоятельство объясняет наш выбор прочтений, экспрессирующихся с промотора LINE (за счет части затравки от LINE-1) и одновременно принадлежащих этому гену (за счет части затравки с интроном). Таким образом были получены транскрипты с известным количеством прочтений с LINE-1 ASP. Перед оценкой количества транскриптов с LINE-1 ASP в образцах плаценты были применены дополнительные фильтры: исключены транскрипты, у которых покрытие после LINE < до LINE (3000 в среднем по образцам), а также те, у которых покрытие после LINE = 0 (2000 в среднем). Для каждого гена после фильтрации был вычислен индекс, представляющий собой отношение числа прочтений, содержащих затравку LINE-1, к среднему покрытию в экзонах после LINE-1 ASP.

Результаты

С помощью разработанного алгоритма биоинформатического анализа были обработаны данные транскриптомов плаценты, полученные из базы данных ENA (PRJEB38810). После анализа 14 транскриптомов плаценты были выделены 1146 транскрипта, принадлежащих 223 генам, для которых покрытие после вставки LINE-1 больше, чем до нее. Это указывает на то, что есть дополнительная экспрессия с альтернативного промотора LINE. Был проведен анализ обогащения этих 223 генов, однако значимых обогащений каких-либо категорий не было. Поэтому были проанализированы те функции генов, которые могут быть критичны для развития плаценты и эмбриона в период имплантации. Несколько генов из списка (KIF7, EVC2, GALNT11, POC1B, TMEM67) непосредственно связаны с функционированием первичных ресничек или цилий. Это тонкая волосовидная структура, выступающая из поверхности клетки, позволяет клеткам реагировать на сигналы окружающей среды посредством обширного состава рецепторов на поверхности ее мембраны [2]. Она служит в качестве сигнального узла для различных стимулов из внеклеточной среды и присутствует почти во всех клетках позвоночных. В частности, сигнальный путь Hedgehog, опосредован исключительно первичной ресничкой [3]. Дисфункция этой органеллы приводит

к многочисленным тяжелым расстройствам человека, называемыми цилиопатиями [4]. Во время развития плаценты процесс эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) является ключевым этапом для экстраворсинчатого трофобласта, который приобретает повышенную миграционную и инвазивную способность, что позволяет ему проникать в материнскую децидуальную оболочку. Путь Hedgehog способен индуцировать ЭМП в трофобластах, запуская экспрессию ключевых транскрипционных регуляторов, таких как Snail1. Активация пути Hedgehog также важна для поддержания синцитиотрофобласта, еще одного важного типа клеток в плаценте [5].

Был сравнен уровень экспрессии с LINE-1 ASP в плаценте и лимфоцитах периферической крови ($n = 2$). Первичные данные 2 транскриптомов лимфоцитов получены из базы данных ENA (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJNA701009>) и проанализированы соответственно приведенному выше алгоритму за исключением этапа фильтрации по значению покрытия после и до LINE, так как можно потерять те транскрипты/гены, которые не экспрессируются во взрослом возрасте и поэтому их покрытие после LINE = 0 или меньше, чем до вставки. Полученные индексы экспрессии в плаценте и лимфоцитах были объединены по транскриптам. Подсчитаны медианные индексы для каждого транскрипта внутри групп плаценты и лимфоцитов и определена дельта (медианный индекс плаценты – медианный индекс контроля). Отобраны транскрипты, у которых медианный индекс > индекса контроля на 10 %. Предполагается, что применение фильтров позволит выявить транскрипты, для которых существуют значительные количественные различия в экспрессии.

В результате сравнения индексов экспрессии между образцами плаценты и лимфоцитов получено 6 транскриптов четырех генов, у которых индекс плаценты > индекса лимфоцитов на 10 %. Три из четырех генов связаны с цилиопатиями (ICA1, BMAL2, KIF7).

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экспрессия с альтернативного промотора LINE-1 в плаценте может играть ключевую роль в регуляции генов, связанных с функционированием первичных ресничек и сигнальных путей, таких как Hedgehog, которые критичны для развития плаценты и эмбриона. Эти данные открывают новые перспективы для изучения роли ретротранспозонов в развитии плаценты и их вклада в патологии беременности.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 24-25-00335.

Список литературы

1. Shridhar V, Chu T, Simhan H, Shaw P. A, Peters D.G. High-resolution analysis of the human placental DNA methylome in early gestation. – Текст: электронный // Prenat Diagn – 2020. – Vol. 4. – URL: <https://doi.org/10.1002/pd.5618> (дата обращения: 28.02.2024).
2. Saito M., Otsu W., Miyadera K., Nishimura Y. Recent advances in the understanding of cilia mechanisms and their applications as therapeutic targets. – Текст: электронный // Front. Mol. Biosci. – 2023. – Vol. 10. – URL: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1232188>
3. Huangfu D., Anderson K.V., Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. – Текст: электронный // Development. – 2006. – Vol. 3. – URL: <https://doi.org/10.1242/dev.02169>
4. Reiter J.F., Leroux M.R., Francisco S., Columbia B. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. – Текст: электронный // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2017. – Vol. 18. – URL: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.60>.
5. Takai H., Kondoh E., Mogami H., Kawasaki K. et al. Placental Sonic Hedgehog Pathway Regulates Fetal Growth via the IGF Axis in Preeclampsia. – Текст: электронный // J Clin Endocrinol Metab. – 2019. – Vol. 9. – URL: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2019-00335>

УДК 58.032.3:577.171.53

**Влияние 28-гомокастастерона на растения *Brassicanapus* в оптимальных
и стрессовых условиях**

Д.С. Мельник

Научный руководитель: с.н.с, к.б.н. О.К. Мурган
Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050
E-mail: melnik.darya.86@gmail.com

Effect of 28-homocastasterone on *Brassica napus* plants under optimal and stress conditions

D.S. Melnik

Scientific Supervisor: Ph.D. O.K. Murgan
Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050
E-mail: melnik.darya.86@gmail.com

Abstract. *Climate change contributes to an increase in the frequency and duration of drought. One of the possible ways to reduce the negative effects of abiotic factors is the use of phytohormones, such as 28-homocastasterone (HCS). In our work, the effect of HCS on the parameters of chlorophyll a fluorescence for rapeseed plants under prolonged soil drought (5 weeks) was demonstrated. The contribution of hormonal effects to the accumulation of biomass, the content of photosynthetic pigments and the activity of the antioxidant enzyme - peroxidase under optimal conditions and at the stage of recovery after stress was assessed. The experiment showed that HCS contribute to an increase in the content of pigments in leaves, enhance peroxidase activity, and also increase the activity of PS II, which is reflected in maintaining the maximum quantum yield of the second photosystem during stress.*

Key words: *Brassica napus, PAM, drought, oxidative stress.*

Введение

Дефицит почвенной влаги – один из факторов абиотического стресса, лимитирующих продуктивность многих сельскохозяйственных культур. В современных условиях изменения климата наблюдается увеличение частоты и продолжительности засух во многих регионах. В связи с чем, изучение влияния засухи и эффективности последующего восстановления водного режима, а также анализ роли брассиностероидов в данных процессах для основных сельскохозяйственных культур является актуальной задачей.

Известно, что водный дефицит приводит к формированию окислительного стресса у растений и увеличению генерации активных форм кислорода (АФК). Окислительный стресс, в свою очередь, негативно влияет на биологические процессы в организме, в том числе снижает продуктивность фотосинтеза, что приводит к замедлению процессов роста и развития культур, снижая их урожайность [1].

Одним из возможных способов снижения негативных действий абиотических факторов является применение фитогормонов, например, брассиностероидов (БС). В настоящее время на их основе производят агропрепараты – симуляторы роста (например, ЭПИН изэпин-экстра), однако также известно и о стресс-протекторных свойствах БС [2].

Рапс (*Brassicanapus*L.) является важной сельскохозяйственной культурой, урожайность которой в значительной степени определяется почвенно-климатическими условиями. В частности, растения рапса чувствительны к дефициту почвенной влаги. При этом рапс является второй по значимости масличной культурой в мире и распространённым модельным объектом для фундаментальных исследований.

В нашей работе мы оценили динамику изменений параметров флуоресценции хлорофилла *a* для растений рапса в норме и при стрессе, а также продемонстрировали

влияние брассиностероида – 28-гомокастастерона на накопление биомассы, содержание фотосинтетических пигментов, фотохимическую активность фотосистемы II (ФС II) и активность антиоксидантного фермента – пероксидазы [3].

Экспериментальная часть

Объектом исследования выбрано растение ярового рапса сорта Хантер (*Brassica napus L.*). Для анализа было отобрано 60 семян рапса, половину из которых поместили в чашку Петри с дистиллированной водой, а вторую часть – в 7 мл водного раствора 28-гомокастастерона (ГКС) $1 \cdot 10^{-8}$ М. Семена стратифицировались при температуре $+4^\circ\text{C}$ в течение трёх суток. Далее семена проращивали на свету. Открытые семена из первой чашки Петри высаживались в увлажнённый почвенный грунт. Сосуды были разделены на три равные группы. Первую – контрольную группу поливали каждые двое суток. Во второй и третьей группах моделировались условия засухи методом полного прекращения полива. После четырех недель такого режима в третьей группе был восстановлен полив. Семена, обработанные гормоном, были высажены и разделены на три группы аналогичным способом. Таким образом, в ходе эксперимента были получены шесть групп растений рапса. Все растения росли на свету, в фитотроне.

Через 5 недель, мы измеряли сырую массу надземной части растений, а также содержание фотосинтетических пигментов и активности гваякол-зависимой пероксидазы [2].

Для оценки содержания фотосинтетических пигментов листья первого и третьего яруса растирали в жидком азоте, навеску около 20 мг переносили в 96 % этанол. Гомогенат центрифугировался. Полученный супернатант сливался в мерную пробирку, а осадок заливался спиртом для повторной экстракции. Итоговый объем вытяжки доводился до 3 мл. Оптическую плотность спиртового раствора измеряли при 470, 648 и 664 нм на спектрофотометре, содержание пигментов рассчитывали согласно формуле [4].

Для оценки активности гваякол-зависимой пероксидазы листья первого и третьего яруса растирали в жидком азоте и навеску около 100 мг переносили в 0,066 М калий-фосфатный буфер (0,5 М дитиотрейтола, 0,1 М фенилметилсульфонилфторида в диметилсульфоксиде) с нерастворимым поливинилпирролидоном. Затем образцы центрифугировали и отбирали супернатант. Реакционная смесь: 50 мкл супернатанта, 1,95 мл 0,066 М фосфатного буфера, 200 мкл 7мМ гваякола, 250 мкл 0,01 М H_2O_2 . Динамику изменения оптической плотности раствора измеряли при 470 нм на спектрофотометре [5].

Активность пероксидазы рассчитывали относительно содержания белка. Для этого полученные супернатанты наносили по 5 мкл в двукратной повторности на хроматографическую бумагу. Через сутки бумагу с пробами окрашивали с помощью красителя Кумасси R250. После окрашивания листы промывали дистиллированной водой. Пятна с пробами вырезали и заливали 3 мл 1 % SDS (Sodiumdodecylsulfate). Пробирки тщательно перемешивались. Оптическая плотность полученного раствора измеряли при 600 нм на спектрофотометре [6].

Флуоресценцию хлорофилла *a* оценивали в листьях через 14, 21 и 28 суток роста растений рапса в сосудах с почвой при помощи портативного импульсного флуориметра MINI-РАМ-II по следующим параметрам: максимальный фотохимический квантовый выход ФС II (F_v/F_m) и нефотохимическое тушение (NPQ). Растения предварительно инкубировали в темноте 30 минут [7].

Результаты

В рамках нашего исследования показано, что к пятой неделе эксперимента гормональное воздействие на растения в контрольных условиях способствовало увеличению количества пигментов в нижнем ярусе растений: хлорофилла *a* на 17 %, хлорофилла *b* на 26 %, каротиноидов на 24 %. В тоже время БС не оказывал достоверного эффекта на данный

параметр для листьев второго яруса. Активность пероксидазы верхнем ярусе листьев была выше на 24 % у растений, обработанных гормоном.

Влияние БС также отразилось и на значении максимального квантового выхода второй фотосистемы (Fv/Fm). На протяжении всего эксперимента показатель был выше у растений, обработанных ГКС, достигнув максимальной разницы в 4 % на 28 сутки роста, что указывает на увеличение фотосинтетической активности. Обработка фитогормоном также способствовала накоплению биомассы на 19 %. Прекращение полива растений приводило к постепенному снижению значения максимального квантового выхода, что являлось индикатором стрессового состояния растений [7]. Гормональная обработка семян незначительно способствовала сохранению данного параметра: значение Fv/Fm было на 3 % выше. Также стоит отметить, что значения нефотохимического тушения (NPQ) при засухе у растений, необработанных БС, был выше, чем у обработанных. На первую неделю измерений разница составила 17 %, но в дальнейшем она постепенно снизилась до 5 %. После возобновления режима полива наблюдалось увеличение содержания фотосинтетических пигментов на 22–32 % для необработанных БС растений и на 13 % обработанных. При этом параметры активности второй фотосистемы, а также гваякол-зависимой пероксидазы значительно не различались между обработанными и необработанными БС растениями и соответствовали значениям контрольного варианта. Биомасса растений была значительно меньше, относительно контроля. Однако не было достоверного эффекта гормонального воздействия на данный показатель.

Заключение

В ходе эксперимента было показано, что брассиностероиды повышают содержание пигментов в листьях, усиливают активность пероксидазы, а также увеличивают активность фотосинтеза, что отражается на поддержании максимального квантового выхода второй фотосистемы во время воздействия стресса. Роль гормона в процессе восстановления достоверно не определена, что указывает на необходимость дополнительной обработки в процессе роста, поскольку отсутствие эффекта может быть связано с длительностью стрессового воздействия.

Исследование поддержано проектом Российского научного фонда (№ 23-44-10019)

Список литературы

1. Batool M., El-Badri A.M., Hassan M.U., Haiyun Y., Chunyun W., Zhenkun Y., Jue K., Wang B., Zhou G. Drought stress in Brassica napus: effects, tolerance mechanisms, and management strategies // Journal of Plant Growth Regulation. – 2023. – № 42. – P. 21–45.
2. Ефимова М.В., Коломейчук Л.В., Бойко Е.В., и др. Физиологические механизмы устойчивости растений *Solanum tuberosum* L. к хлоридному засолению // Russian Journal of Plant Physiology, – 2018. – Т.65, № 3. – С.196–206.
3. Гольцев В.Н., Каладжи М.Х., Кузманова М.А., Аллаhverиев С.И. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла *a* – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений. – Ижевск : Институт компьютерных исследований, 2014. – С. 220.
4. Lichtenthaler H.K. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods in Enzymology. – 1987. – Vol. 148. – P. 350–382.
5. Шевякова Н.И., Стеценко Л.А., Мещеряков А.Б., Кузнецов Вл.В. Изменение активности пероксидазной системы в процессе стресс-индуцированного формирования САМ // Физиология растения. – 2002. – Т. 49. – С. 670–677.
6. Esen A. A simple method for quantitative, semi quantitative, and qualitative assay of protein // Anal. Biochem. – 1978. – Vol. 89. – P. 264–273.
7. Лысенко В.С., Вардуни Т.В., Соьер В.Г., Краснов В.П. Флуоресценция хлорофилла растений как показатель экологического стресса: теоретические основы применения метода // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 4. – С.112–120.

УДК 577

Разработка и создание биосенсорной системы для детекции IPTG на основе синтетической конструкции cI/Plam_RFP логического вентиля NOT в клетках *E. coli*С.А. Мельникова

Научный руководитель: доцент, к.б.н. А.А. Коханенко
Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050
E-mail: sonnata03@gmail.com

Development and construction of an IPTG biosensor system based on a synthetic cI/Plam_RFP logic gate in *E. coli* cellsS.A. Melnikova

Scientific Supervisor: Ass. Prof., Ph.D. A.A. Kohanenko
Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050
E-mail: sonnata03@gmail.com

Abstract. *In this study, we report the creation of a genetically engineered cI/Plam_RFP construct based on a NOT logic gate for detecting IPTG in E. coli cells. Both classical bioengineering methods, such as restriction and ligation, and more advanced ones, such as Gibson assembly, were applied. The effectiveness of the synthetic construct was confirmed by transforming cells of the DH5a strain with a recombinant vector and culturing them on a selective medium. When IPTG was added to the culture medium, RFP suppression was observed in bacterial cells, which led to fluorescence arrest.*
Key words: *NOT gate, synthetic biology, genetic circuits, gene engineering.*

Введение

Создание генетических конструкций на основе логических вентилях позволяет управлять экспрессией генов интереса за счет активации или подавления определенных биохимических путей внутри клеток [1, 2]. Используя подходы инженерии и современные методы молекулярной биологии становится возможным синтезировать генетические сети, изменяющие свойства живых организмов. В основе каждой генетической сети лежат логические вентили аналогичные тем, что используются в электронных микросхемах. Практическое применение молекулярных логических вентилях обширно: различные синтетические конструкции могут быть использованы для обнаружения раковых клеток, обнаружения ионов, мониторинга загрязнения среды [3], а также для детекции и уничтожения патогенных организмов.

Молекулярный логический вентиль NOT – это простейшая биохимическая схема, имеющая один входной сигнал. Его работа основана на действии инвертора – элемента, преобразующего исходный сигнал в противоположный ему по смыслу. Такая система особенно наглядно может быть применена в качестве способа детекции определенных веществ в среде. Целью данной работы является разработка и создание генетической конструкции cI/Plam_RFP на основе логического вентиля NOT.

Экспериментальная часть

Разработка синтетической конструкции осуществлялась *in silico* в ПО SnapGene. В качестве несущего вектора была выбрана коммерческая плаزمиды рЕТ-15b. Для создания молекулярного логического вентиля NOT создана система, состоящая из трех модулей: входа – воспринимающего входной сигнал, инвертора – переключателя состояние системы, выхода – формирующего выходной сигнал. Вход и инвертор состоят из различных пар репрессор-промотор, осуществляющих пространственно-временную регуляцию транскрипции. При подборе промоторов и репрессоров для создания молекулярного логического вентиля

нами в первую очередь рассматривались такие функциональные элементы, работу которых можно реализовать в клетках *E. coli* за счет работы собственного бактериального синтетического аппарата. Конструкция вентиля подразумевает контроль выходного сигнала за счет регуляции экспрессии RFP. Модуль *cl/Plam* (репрессор и промотор фага лямбда) в конструкции выполняет функцию инвертора, то есть его работа определяет значение выходного сигнала. В качестве системы, воспринимающей входной сигнал, был выбран регуляторный элемент лактозного оперона *LacI/Plac*, реагирующий на наличие в среде культивирования IPTG. Присутствующий в среде IPTG репрессирует работу белка *LacI*, что в свою очередь снимает репрессию с промотора лактозного оперона *lacP*. Под управлением этого промотора находится первый элемент инвертора – ген *cl*, кодирующий лямбда-репрессор. Белок-репрессор подавляет транскрипцию с соответствующего промотора *Plam*, тем самым предотвращая появления флуоресцентного сигнала RFP. При отсутствии IPTG наблюдается обратный результат (рис. 1).

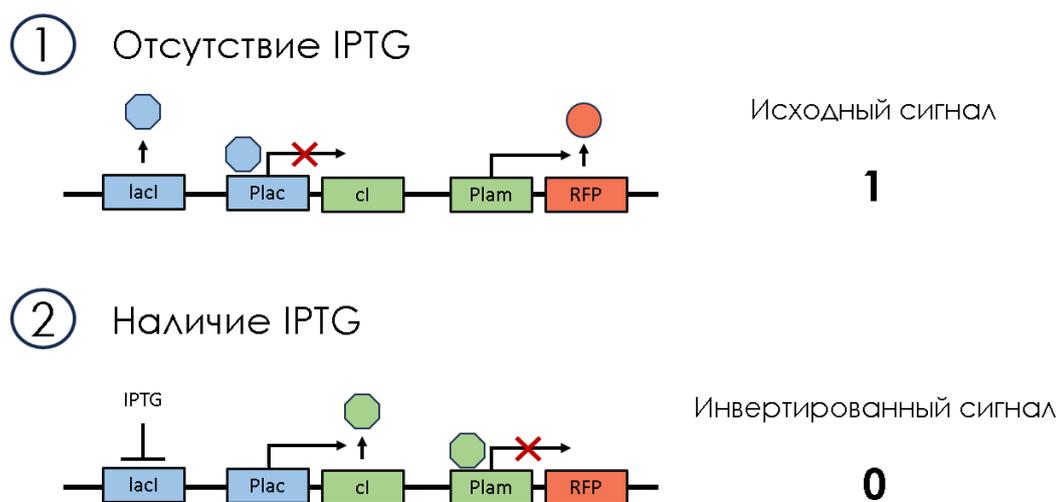


Рис. 1. Схема работы генетической конструкции *cl/Plam_RFP* на основе логического вентиля NOT

Сборка конструкции осуществлялась путем поэтапного клонирования элементов вентиля с помощью метода рестрикции и лигирования. Последовательности генов RFP, *Plam* и *cl* были амплифицированы с помощью ПЦР. Ампликоны будущих функциональных элементов вентиля были проверены на соответствие ожидаемым длинам, а также очищены из геля после проведения гель-электрофореза. После каждого акта клонирования производилась трансформация рекомбинантным вектором химически компетентных клеток *E. coli* штамма поддержки DH5 α и посев их на агаризованную LB-среду. Все этапы клонирования контролировались с помощью анализирующей рестрикции с эндонуклеазой *VneI*, а также colony-ПЦР.

Коммерческий вектор экспрессии *pET-15b* уже содержит в своей последовательности ген *LacI*, поэтому последним этапом сборки конструкции являлось клонирование элементов лактозного оперона *LacO* и *LacP* из вектора *pUC19* методом сборки по Гибсону. Амплификация фрагментов производилась с помощью ПЦР с использованием high-fidelity полимеразы. Результат сборки был проверен путем посева трансформированных бактерий на среду, содержащую 0,5 М IPTG.

Результаты

Трансформированные рекомбинантным вектором клетки *E. coli* были высеяны на агаризованную LB-среду без содержания селективного маркера IPTG. Был проведен отбор красных колоний, которые затем были пересеяны на аналогичную среду культивирования с

добавлением 0,5 М IPTG. В ряде случаев наблюдалось изменение цвета пересеянных колоний с красного на белый (рис. 2).

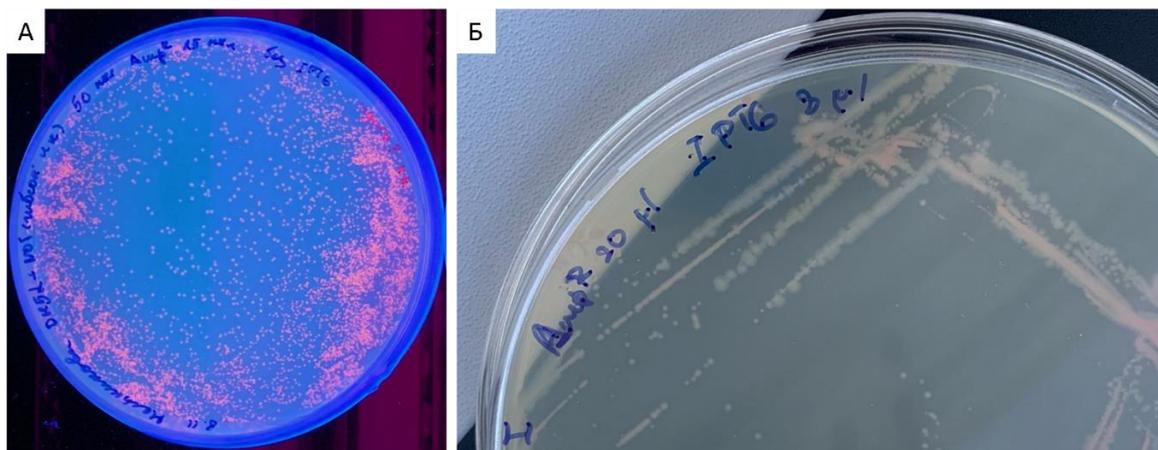


Рис. 2. Проверка работы конструкции *cI/Plam_RFP* путем посева колоний на селективную среду, содержащую IPTG: А – без IPTG, Б – с IPTG

Колонии, в которых наблюдалось изменение окраски, были проверены на наличие вставки элементов лактозного оперона методом colony-ПЦР и анализирующей рестрикцией эндонуклеазой *VneI*. Результат гель-электрофореза показал, что данные колонии содержат вставку генов *LacO* и *lacP* из *rUC19*.

Для верификации рекомбинантного вектора были разработаны праймеры для секвенирования конструкции *cI/Plam_RFP*, а также праймеры для проверки гена *LacI*. Было выяснено, что между геном *cI* и оператором лактозного оперона отсутствует сайт связывания рибосом – последовательность Шайна-Дальгарно (RBS), что может оказать влияние на уровень экспрессии репрессора фага лямбды. Для этого был осуществлен заказ праймеров, к которым помимо сайта рестрикции перед старт-кодом амплифицируемого гена будет встроена RBS.

Заключение

В результате проведенной работы был создан рекомбинантный вектор, содержащий генетическую конструкцию *cI/Plam_RFP* логического вентиля NOT. Разработанная биосенсорная система показала ожидаемый результат при посеве трансформированных бактерий на среду, содержащую селективный маркер IPTG: наблюдалась репрессия гена RFP, что приводило к окрашиванию клеток *E. coli* в белый цвет. К настоящему времени производится сборка второго варианта конструкции, учитывающего наличие RBS перед последовательностью гена *cI*, оптимизация условий экспрессии всех функциональных элементов вентиля, а также подготовка конечной конструкции к секвенированию.

Список литературы

1. Vasilev R.A., Chernikovich V.U., Evteeva M.A., et al. Synthetic biology. Current state and applications // *Mol. genet. mikrobiol. virusol.* – 2021. – Vol. 39, № 1. – P. 18.
2. Liu L., Liu P., Ga L., et al. Advances in Applications of Molecular Logic Gates // *ACS Omega.* – 2021. – Vol. 6, № 45. – P. 30189–30204.
3. Silva-Rocha R., de Lorenzo V. Engineering multicellular logic in bacteria with metabolic wires // *ACS synthetic biology.* – 2014. – Vol. 3, №. 4. – P. 204-209.

УДК 615.07

**Определение высвобождения наночастиц серебра из различных лекарственных форм
для местного применения**

А.М. Минько, Д.А. Михалев

Научный руководитель: доцент, д.ф.н., М.В. Зыкова
Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2, 634050

E-mail: nas.minko@yandex.ru

**The release determination of silver nanoparticles from different types of topical
pharmaceutical form**

A.M. Minko, D.A. Mikhalev

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., Dr. M.V. Zyкова
Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovskiy trakt, 2, 634050

E-mail: nas.minko@yandex.ru

Abstract. *The use of antiseptic properties of silver is often complicated by its toxicity as a heavy metal. In this work an approach to solve this problem is proposed – bionanomaterial based on silver nanoparticles and humic substances. Determination of silver nanoparticles yield from semi-solid dosage forms by vertical diffusion method using Franz cell was carried out. The obtained results can be used to substantiate the application of ointment or gel in diseases of different genesis.*

Key words: *ointment; gel; humic substances; silver nanoparticle.*

Введение

Серебро широко известно своими антисептическими свойствами, которые использовались с древних времен в изготовлении посуды и медицинских инструментов. С развитием науки и медицины серебро стали внедрять в фармакотерапию инфекционных заболеваний. На сегодняшний день экспериментально доказана эффективность серебра против грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), а также грамположительных бактерий, например *Staphylococcus aureus*, включая метициллин-резистентные штаммы (MRSA) [1].

В конце XIX-начале XX века для лечения инфекций, ран, глазных инфекций, как антисептик и антибактериальное средство, стало набирать популярность коллоидное серебро. Коллоидное серебро состоит из наночастиц серебра (размером от 1 до 100 нм), взвешенных в жидкости. Наночастицы серебра (AgNPs) обладают выраженными антибактериальными и антисептическими свойствами, что делает их перспективными при лечении гнойно-воспалительных и инфекционных процессов, а также в разработке различных мазей, гелей на их основе. Механизм действия AgNPs состоит из высвобождения ионов серебра (Ag^+), которые взаимодействуют с клеточными мембранами и ДНК, образования активных форм кислорода (АФК), повреждающих клеточные структуры, а также нарушения метаболических процессов микроорганизмов.

Несмотря на выраженные антимикробные свойства, серебро, как тяжелый металл может оказывать токсическое действие. После высвобождения из наночастиц, накопление ионов серебра происходит в печени, вызывая окислительный стресс; в почках, повреждая почечные каналы; в коже, где длительное воздействие наночастиц может привести к аргирозу – необратимому изменению цвета кожи на серо-голубой оттенок. Однако, токсичность AgNPs можно значительно снизить при их совместном использовании с гуминовыми лигандами в производстве бionanomaterialов.

Гуминовые вещества – это темноокрашенные органические соединения, получаемые в процессе биосинтеза из природных источников, таких как бурый уголь, торф, мумие.

По химической структуре гуминовые вещества (ГВ) представляют собой супрамолекулярные комплексы, различного химического и функционального состава [2]. Именно наличие большого количества функциональных групп и стабильных радикалов в молекулах ГВ объясняет их широкий спектр действия на системы и органы человека.

Целью работы является определение высвобождения наночастиц серебра (AgNPs) из мази с линкомицином на адсорбционной основе и гидрофильного геля на основе карбоксиметилцеллюлозы, а также оценить их потенциальный терапевтический эффект.

Экспериментальная часть

Исследование включало разработку двух лекарственных форм для местного применения: эмульсионной мази на адсорбционной основе вазелина и безводного ланолина с Линкомицином и гидрофильного геля на основе карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Действующее вещество – бионаноматериал на основе AgNPs и угольных гуминовых веществ (СНР-AgNPs), синтезированный в лаборатории природных гуминовых систем химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Технология изготовления мази (3 % по серебру) с 0,2 % Линкомицином заключалась в следующем: навеску 8,33 г СНР-AgNPs отвешивали на аналитических весах, далее субстанцию помещали в ступку и растворяли в 10 мл воды очищенной, добавляли 0,2 г субстанции Линкомицина гидрохлорида и размешивали пестиком до полного растворения. Затем добавляли 40,0 г предварительно разогретого на водяной бане ланолина безводного по частям и эмульгировали пестиком, постепенно прибавляя, разогретые аналогичным способом, 50,0 г вазелина, итого получилось 100,0 г однородной, эмульсионной мази на адсорбционной основе.

Технология изготовления геля состава СНР-AgNPs (2 % по серебру) осуществляли согласно следующей методике: 2,0 г карбоксиметилцеллюлозы в натриевой форме (Na-КМЦ) растворяли в 100,0 мл воды при 25 °С с образованием вязкого 2 %-ного гелевого раствора. Затем в ступку помещали 5,55 г СНР-AgNPs и смешивали с 30,0 г гелевой основы (2 % КМЦ), размешивали пестиком до полного растворения и образования однородной массы, затем доводили массу готовой лекарственной формы гелевой основой (КМЦ, 2 %) до 100,0 г.

Исследование высвобождения AgNPs проводили методом вертикальной диффузии, с помощью вертикальной диффузионной ячейки Франца (модель НДТ1000). Тестер НДТ1000 представляет собой устройство, предназначенное для определения высвобождения лекарственного средства из полутвердых лекарственных форм, к которым относятся крема, мази, гели и лосьоны. Данный прибор, вмещает в себя 10 диффузионных ячеек, состоящих из двух частей: донорная (камера для образцов) и рецепторная камера, содержащая рецепторный раствор (среда). Эти две части разделены специальной высокопроницаемой мембраной, предназначенной для использования в качестве проводящего канала для диффузии. Мазь или гель наносили на диализную гидрофильную полиэфирсульфоновую мембрану с размерами пор 450 нм, диаметром 25 мм, с размещенной на ней пластмассовым кольцом. Содержимое ячеек перемешивали при помощи магнитной мешалки на скорости 400 об/мин. Количественное содержание наночастиц серебра определяли на спектрофотометре ПЭ-5400УФ в кварцевых кюветах 1 см в интервале 410–425 нм с шагом 2 нм. Концентрацию высвободившихся наночастиц серебра из образца СНР-AgNPs оценивали по калибровочному графику, полученному при различных разведениях раствора СНР-AgNPs.

Результаты

В результате исследования высвобождения AgNPs из эмульсионной мази на основе адсорбции, среднее значение составило 0,63 %, что свидетельствует о низкой системной токсичности Ag как тяжелого металла и возможности длительного применения металла, а

также о возможности длительного применения и пребывания мази на раневой поверхности. Результат исследования высвобождения AgNPs из гидрофильного геля на основе карбоксиметилцеллюлозы составил 11,13 %, что свидетельствует о высокой способности AgNPs высвобождаться из лекарственной формы и оказывать быстрое антисептическое действие, смешиваясь в ране с биологическими жидкостями.

Таблица 1

Результаты высвобождения наночастиц серебра

№ повтора	Масса мази/геля, нанесенного на мембрану, мг	Масса наночастиц Ag в мазевой/гелевой суспензии, нанесенной на мембрану, мг	Концентрация наночастиц Ag, высвобожденных в поглощающую среду через сутки, мг/мл	Выход наночастиц, %
эмульсионная мазь на адсорбционной основе				
1	146,0 ± 1,0	2,919 ± 0,022	0,0032 ± 0,0007	0,77 ± 0,14
2	144,0 ± 1,0	2,875 ± 0,022	0,0019 ± 0,0007	0,49 ± 0,14
3	145,0 ± 1,0	2,899 ± 0,022	0,0025 ± 0,0007	0,63 ± 0,14
Среднее значение	145,0 ± 1,0	2,898 ± 0,022	0,0025 ± 0,0007	0,63 ± 0,14
гидрофильный гель на основе карбоксиметилцеллюлозы				
1	147,0 ± 2,7	2,94 ± 0,05	0,047 ± 0,001	11,06 ± 0,07
2	143,0 ± 2,7	2,86 ± 0,05	0,046 ± 0,001	11,13 ± 0,07
3	142,0 ± 2,7	2,84 ± 0,05	0,045 ± 0,001	11,20 ± 0,07
Среднее значение	144,0 ± 2,7	2,88 ± 0,05	0,046 ± 0,001	11,13 ± 0,07

Заключение

Таким образом, первая лекарственная форма (мазь на адсорбционной основе) является наиболее предпочтительной для лечения вялотекущих хронических гнойно-воспалительных процессов и пролежней. Механизм действия мази предположительно заключается в том, что она адсорбирует содержимое раны вместе с инфекционными агентами, а внутри мази активный компонент СНР-AgNPs, совместно с линкомицином оказывает антибактериальное и антисептическое действие. Вторая лекарственная форма (гидрофильный гель на основе карбоксиметилцеллюлозы), является наиболее предпочтительной для лечения открытых ран, в том числе больших по площади и требующих частого применения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-65-47052).

Список литературы

1. Таусарова Б.Р., Кутжанова А.Ж., Сулейменова М.Ш., Маукенова А.Н. Антибактериальные свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы / Вестник Алматинского технологического университета. – 2014. – № 1. – С. 76–83.
2. Perminova, I.V. From green chemistry and nature-like technologies towards ecoadaptive chemistry and technology // Pure Appl. Chem. – 2019. – Vol. 91. – Pp. 851–864.

УДК 004.032.26 : 576.08 : 576.5

**Анализ индуцированной агрегации белка TDP-43 в мозге мышей
с помощью методов машинного обучения**М.Р. Наздрачева

Научный руководитель: д.б.н. М.С. Кухарский

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Россия, Москва, ул. Островитянова, дом 1, 117513E-mail: nazdracheva2001@mail.ru**Analysis of induced TDP-43 protein aggregation in mouse brain using machine learning
methods**M.R. Nazdracheva

Scientific Supervisor: Dr. M.S. Kukharsky

Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Russia, Moscow,
Ostrovityanova str., 1, 117513E-mail: nazdracheva2001@mail.ru

Abstract. Neurodegenerative diseases are characterized by a progressive loss of selectively sensitive neuronal populations, and a common feature of pathogenesis is the formation of protein aggregates. In this study, we analyzed the pathological protein aggregation of TDP-43, which was induced by stereotaxic injection of Tau protein aggregates into the mouse brain. A statistically significant decrease in the fluorescence intensity of TDP-43 was found in the brain of mice in the experimental group, and abnormal nuclear-cytoplasmic distribution of TDP-43 protein with the formation of its aggregates was revealed. The images obtained with a fluorescence microscope served as a dataset for developing a machine learning model for cell recognition and counting, fluorescence signal measurement and recognition of protein aggregates in cells of histological sections. The developed model was evaluated using the following metrics: Sensitivity = 90.9 %, Specificity = 80.7 %, Precision = 89.3 %, and it can be said that it achieved the target quality metrics.

Key words: neurodegenerative diseases, protein aggregates, TDP-43, machine learning model.

Введение

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) – гетерогенная группа неврологических заболеваний, характеризующихся функциональной дисфункцией нейронов, их гибелью и последующей прогрессирующей дегенерацией различных областей нервной системы. Точные механизмы развития НДЗ остаются неясными и на сегодняшний день не разработано эффективных терапевтических методов для замедления, остановки или предотвращения любых НДЗ [1].

Общей чертой многих НДЗ является образование белковых агрегатов. Во многих случаях одновременная агрегация нескольких патогенных белков может происходить в одной и той же клетке, способствуя прогрессированию заболевания и развитию смешанных клинических проявлений. Вопрос о том, являются ли эти агрегаты токсичными, безвредными или даже защитными в процессе заболевания, остается предметом дискуссий. Два основных белка, которые накапливаются в мозге при лобно-височной деменции – это Тау-белок и TDP-43. Тау-белок – это ассоциированный с микротрубочками белок, который участвует во многих молекулярных процессах, включая синаптическую пластичность, клеточную сигнализацию и регуляцию стабильности аксонов. ДНК-связывающий белок TAR (TDP-43) – многофункциональный белок, который связывается с нуклеиновыми кислотами и участвует в метаболизме РНК [2]. Изучение механизмов инициации агрегации и взаимодействия между разными патогенными белками в нервной системе является актуальной научной задачей.

В настоящее время золотым стандартом диагностики НДЗ является патологоанатомическая экспертиза при вскрытии [3]. Компьютерное зрение и методы глубокого обучения предоставили новые возможности для автоматизации этого процесса и улучшения его эффективности. Для более детального анализа гистологических срезов разных областей головного и спинного мозга очень важна способность получать изображения, выделять и изучать разные типы клеток, их субклеточные компартменты.

Экспериментальная часть

Из мозга трансгенных мышей линии Tau P301S, экспрессирующих мутантный Тау-белок человека, а также от мышей дикого типа линии C57BL/6 были получены гомогенаты мозга методом последовательного центрифугирования с обработкой ультразвуком. Гомогенаты вводились с помощью стереотаксической инъекции в область амигдалы мышам дикого типа. Через 50 дней после инъекции проводили забор материала для гистологического анализа. Было проведено иммуногистохимическое окрашивание для детекции белка TDP-43, ядра клеток окрашивались с помощью красителя DAPI. Анализ изображений проводился в программе ImageJ, полученные изображения были использованы для обучающей выборки.

Модель была обучена с использованием алгоритмов глубокого обучения с применением современной архитектуры нейронной сети Contour Proposal Network (CPN) в сервисе GitHub на языке Python. Contour Proposal Network – структура для сегментации объектов, которая обнаруживает перекрывающиеся объекты на изображении, одновременно подгоняя замкнутые контуры объектов с использованием Фурье дескрипторов [4].

Результаты

Было выявлено статистически значимое снижение количества белка TDP-43 у мышей после инъекций агрегатов Тау-белка. Помимо этого, было обнаружено аномальное ядерно-цитоплазматическое перераспределение белка TDP-43 у мышей опытной группы.

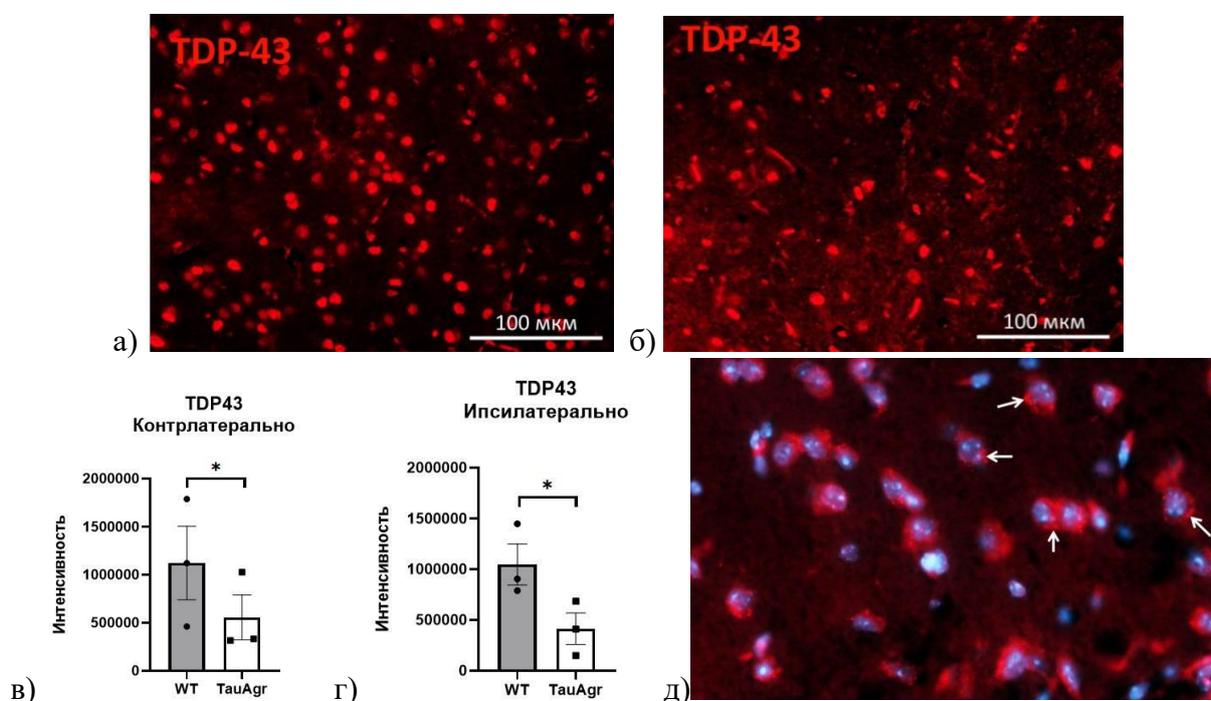


Рис. 1. Результаты иммуногистохимического исследования (синий сигнал – DAPI, красный – TDP-43): а) контрольная группа, б) опытная группа, в), г) зависимости интенсивности флуоресценции TDP-43 в разных группах и полушариях (непараметрический критерий Манна-Уитни, * - $p < 0.05$), д) аномальное ядерно-цитоплазматическое распределение TDP-43 у мышей опытной группы (стрелки – патологические агрегаты)

При выполнении программного кода подсчет клеток и разделение флуоресценции на ядерные и агрегатные компоненты выполняется на основании сегментации клеток, определение их точных границ. Также полученная модель была оценена с помощью метрик: чувствительность (Sensitivity) = 90,9 %, специфичность (Specificity) = 80,7 %, точность (Precision) = 89,3 %, общая точность (Accuracy) = 87,2 %, F1-score = 90,1 %.

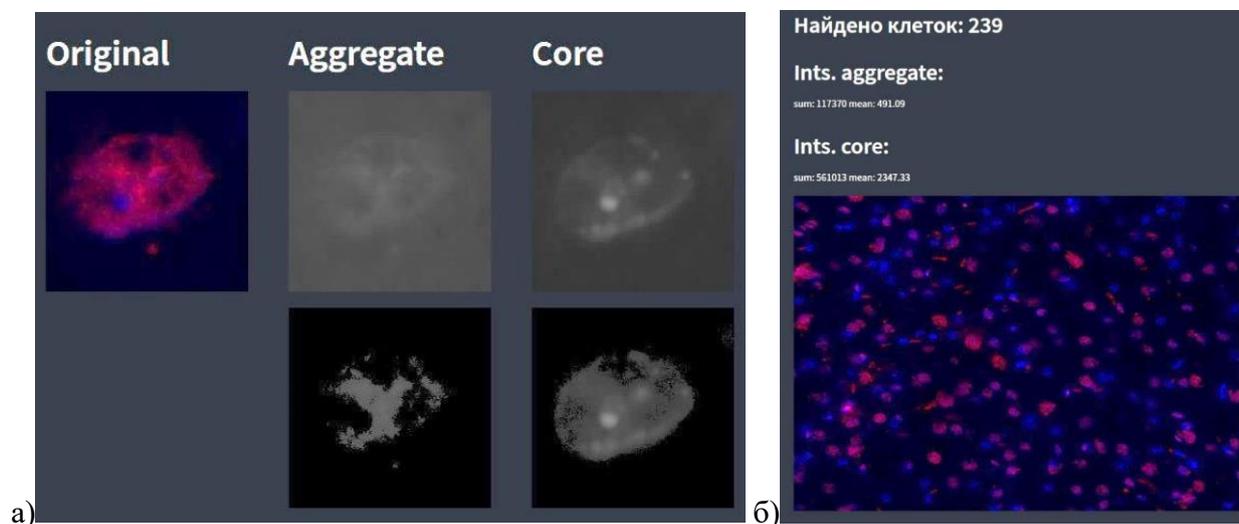


Рис. 2. а) Обнаружение клетки на фотографии гистологического препарата с разделением по компонентам свечения на агрегаты и ядро, б) результат работы программного кода с значениями общего количества клеток и интенсивности флуоресценции агрегатов и ядра

Заключение

Введение экзогенного мутантного Тау-белка в головной мозг мыши влияет на количество и распределение белка TDP-43 в клетках в зоне инъекции. Это может свидетельствовать о влиянии Тау-белка на метаболизм или свойства TDP-43, также связанного с развитием НДЗ. Построенная модель машинного обучения для распознавания и подсчета клеток, измерения сигнала флуоресценции и распознавания белковых агрегатов в клетках гистологических срезов головного мозга мышей, моделирующих нейродегенеративные заболевания человека, работает с достаточно хорошей чувствительностью и специфичностью.

Список литературы

1. Agnello L., Ciaccio M. Neurodegenerative Diseases: From Molecular Basis to Therapy // Int J Mol Sci. – 2022. – V. 23, № 21.
2. Magrath G.N., Zapata-Restrepo L.M, Miller B.L. Advances in Treatment of Frontotemporal Dementia. // J Neuropsychiatry Clin Neurosci. – 2022. – Vol. 34 (4). – P. 316–327. doi: 10.1176/appi.neuropsych. 21060166. Epub 2022 May 17. PMID: 35578801.
3. Dugger B.N., Dickson D.W. Pathology of Neurodegenerative Diseases // Cold Spring Harb. Perspect Biol. – 2017. Vol. 5, № 9 (7). P. a028035. – doi: 10.1101/cshperspect.a028035.
4. Upschulte E., Harmeling S., Amunts K., Dickscheid T. Contour proposal networks for biomedical instance segmentation // Med Image Anal. – 2022. – V. 77. – P. 102371.

УДК 615.12

**Возможность прямого прессования в технологии таблеток эналаприла
при производстве воспроизведенного препарата**

М.А. Нечай

Научный руководитель: доцент, к.фарм.н., В.В. Шейкин
Сибирский государственный медицинский университет
Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050

E-mail: oceangi41@mail.ru

**The possibility of direct pressing in the technology of enalapril tablets
in the production of the reproduced drug**

M.A. Nechai

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., Ph.D. V.V. Sheikin
Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovsky trakt, 2, 634050

E-mail: oceangi41@mail.ru

Abstract. *This article examines the potential application of the direct pressing method in the production of enalapril tablets with an emphasis on the development of a reproducible drug. The study analyzes the physico-chemical and technological properties of enalapril and auxiliary substances. Studies show that these substances have poor technological properties for direct pressing, including low fluidity and high adhesion. The study highlights the importance of a thorough assessment of the physico-chemical and technological properties of substances in the development of pharmaceutical tablet manufacturing processes.*

Key words: *enalapril; tablets; excipients; pressing.*

Введение

Одним из ключевых подходов к обеспечению населения лекарствами является производство доступных препаратов, воспроизводящих оригинальные средства с доказанной эффективностью [1]. При получении таблеток предпочтителен метод прямого прессования, поэтому возможность его применения оценивается в первую очередь. Основным критерием для этого являются физико-химические и технологические свойства активной субстанции и вспомогательных веществ, обеспечивающих приемлемые параметры таблетуемой смеси. На первом этапе исследований целесообразно использовать состав референтного препарата.

Цель работы заключалась в определении перспективы прямого прессования на основе анализа физико-химических и технологических характеристик активной фармацевтической субстанции и вспомогательных веществ для получения таблеток эналаприла.

Экспериментальная часть

Объектами исследования являлись: активная фармацевтическая субстанция эналаприла, лактозы моногидрат, крахмал картофельный, крахмал кукурузный, крахмал прежелатинизированный, натрия гидрокарбонат, магния стеарат и их смеси. В соответствии с методиками Государственной фармакопеи определяли форму и размер частиц, фракционный состав, насыпную плотность, плотность после уплотнения, прессуемость и сыпучесть с использованием стандартных приборов [2].

Результаты

Результаты оценки физико-химических характеристик исследуемых веществ представлены в таблице 1.

Таблица 1

Физико-химические свойства компонентов препарата

Эналаприл	Лактозы моногидрат	Крахмал картофельный	Крахмал кукурузный	Крахмал кукурузный прежел.	Натрия гидрокарбонат	Магния стеарат
Размер частиц, мм						
0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,01 ± 0,01
Форма частиц						
Анизометрические	Анизометрические	Изометрические	Изометрические	Анизометрические	Анизометрические	Анизометрические
Характер поверхности частиц (краев)						
Шершавый	Шершавый	Ровный, гладкий	Ровный, гладкий	Ровный	Ровный	Пористый

Исходя из параметров, указанных в таблице 1, отражающих размер, форму частиц и их поверхность видно, что субстанция эналаприла будет иметь проблемы в отношении сыпучести и используемые вспомогательные вещества не смогут оказать существенное влияние на этот показатель. Это подтверждают результаты экспериментальной оценки сыпучести и угла естественного откоса (таблица 2).

Таблица 2

Сыпучесть, угол откоса компонентов препарата и таблеточных смесей

Эналаприл	Лактозы моногидрат	Крахмал картофельный	Крахмал кукурузный	Крахмал кукурузный прежел.	Натрия гидрокарбонат	Магния стеарат
Сыпучесть, г/сек						
2,2 ± 0,2	3,7 ± 0,3	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,2	4,1 ± 0,2	1,2 ± 0,3
Угол естественного откоса, град						
47,4 ± 0,4	34,7 ± 0,2	34,2 ± 0,1	43,7 ± 0,2	33,6 ± 0,3	31,2 ± 0,2	56,1 ± 0,5
Смесь на 2,5 мг АФС		Смесь на 5 мг АФС		Смесь на 10 мг АФС		Смесь на 20 мг АФС
Сыпучесть, г/сек						
4,17 ± 0,3		4,20 ± 0,2		4,31 ± 0,5		4,29 ± 0,2
Угол естественного откоса, град						
39,2 ± 0,5		38,6 ± 0,2		44,7 ± 0,1		45,2 ± 0,3

Сыпучесть и угол естественного откоса определяют поведение порошка при его перемещении в процессе таблетирования и заполнении матриц. Низкая сыпучесть и высокий угол откоса у исследуемых субстанций указывают на сильное взаимодействие частиц. Таблетлируемые смеси демонстрируют лучшие характеристики сыпучести по сравнению с показателями отдельных компонентов и могут быть использованы для последующего прессования, однако это потребует использования дополнительных технических средств (воронок и дозаторов принудительного типа), что усложнит технологический процесс и отразится на затратах на его осуществление.

Недостаточная сыпучесть веществ и их смесей усугубляется высокими значениями коэффициента Хауснера, отражающего отношение насыпных объемов до и после уплотнения [3] (таблица 3).

Таблица 3

Коэффициент Хауснера

Эналаприл	Лактозы моногидрат	Крахмал картофельный	Крахмал кукурузный	Крахмал кукурузный прежел.	Натрия гидрокарбонат	Магния стеарат
1,64	1,52	1,38	1,47	1,37	1,29	1,32
Смесь на 2,5 мг АФС		Смесь на 5 мг АФС		Смесь на 10 мг АФС		Смесь на 20 мг АФС
1,62		1,64		1,72		1,61

Фракционный состав порошков и их смесей является критическим параметром, определяющим другие технологические характеристики и однородность смеси для таблетирования. Особое внимание уделяется содержанию мелкой фракции (< 0,2 мм), определяющей метод производства: при 80–100 % требуется гранулирование, при до 15 % возможно прямое прессование (таблица 4).

Таблица 4

Фракционный состав, %

Фракция частиц	Эналаприл	Лактозы моногидрат	Крахмал картофельный	Крахмал кукурузный	Крахмал кукуруз. прежел.	Натрия гидрокарбонат	Магния стеарат
> 0,50 мм	1,00	0,13	0,57	0,04	0,09	0,35	2,33
< 0,50мм, > 0,315 мм	10,00	20,20	1,81	0,00	0,78	2,62	4,63
< 0,315 мм, > 0,20 мм	68,00	44,86	0,39	0,28	1,12	14,53	24,43
< 0,20 мм, > 0,16 мм	16,75	26,95	0,23	2,12	6,70	53,78	14,87
< 0,16 мм, > 0,10 мм	3,90	5,80	0,37	4,37	30,36	14,75	39,59
< 0,10 мм, > 0,05 мм	0,30	1,63	43,62	30,21	46,73	13,59	14,09
< 0,05 мм	0,06	0,38	53,01	63,00	14,20	0,40	0,07

Из полученных данных следует, что большинство субстанций представлены мелкодисперсными порошками. Субстанция эналаприла, как и все вспомогательные вещества, также характеризуется высоким уровнем содержания мелкой фракции, что, вероятно, является одной из причин слабой сыпучести материала.

Заключение

На основании проведенных исследований порошков можно сделать вывод, что исследуемые объекты демонстрируют неудовлетворительные значения технологических характеристик, исключающих возможность прямого прессования. Это высокая адгезивность (низкая сыпучесть), высокая уплотняемость (коэффициент Хауснера >1,50) и преобладание мелкой фракции. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования приёма гранулирования при подготовке таблетированной смеси.

Список литературы

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание // Министерство здравоохранения Российской Федерации: сайт – 2023. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/>.
2. Свечкарева И.Р., Шилова Д.Е., Баранова М.И. Проблемы и потенциальные решения дефицита лекарств // Реальная клиническая практика: данные и доказательства. – 2024. – № 4 (2). – С. 29–35.
3. Бркич Г.Э., Пятигорская Н.В., Зырянов О.А. Изучение технологических свойств фармацевтической субстанции на основе производного 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2020. – Т. 22, № 3. – С. 18–23.

УДК 591.4

**Половые различия миелинизации мозга мышей линии CD-1:
количественное МРТ исследование****А.Ц. Ранзаева¹, М.М. Шадрина¹, Д.А. Тур²**

Научный руководитель: профессор, д.б.н. М.Ю. Ходанович

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050²Институт цитологии и генетики СО РАН

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

E-mail: ranzaevaa@yandex.ru**Sex differences in brain myelination in CD-1 mice: a quantitative MRI study****A.Ts. Ranzaeva¹, M.M. Shadrina¹, D.A. Tur²**

Scientific Supervisor: Prof., Dr. M.Y. Khodanovich

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050²Institute of Cytology and Genetics, Russia, Novosibirsk, Academician Lavrentieva str., 10, 630090E-mail: ranzaevaa@yandex.ru

Abstract. *In this work, the sex differences in brain myelination in CD-1 mice were studied using the MRI method of fast macromolecular proton fraction of the (MPF) mapping. MPF is a biophysical parameter, which was validated on various animal models as non-invasive quantitative myelin biomarker. Sex differences in brain myelination of nine adult CD-1 mice (4 males, 5 females) were assessed using MPF mapping. No significant differences between males and females in average MPF values were found. Significant sex differences were found in three of the eight investigated brain structures. In males, MPF was higher by 9.5 % in the anterior commissure and lower, in the corpus callosum by 0.8 % and caudoputamen (6.5 %).*

Key words: *CD-1 mice, MRI, macromolecular proton fraction mapping, myelin, sex differences.*

Введение

Аутбрендная линия мышей CD-1 широко применяется в доклинических исследованиях потенциальных фармпрепаратов. Поскольку аутбрендные мыши являются гетерозиготами по многим признакам в противовес инбрендным линиям мышей, их использование является предпочтительным в экспериментах, направленных на изучение вариабельности воздействий различных заболеваний и иных факторов на физиологические процессы организма. Однако, половые различия важных физиологических признаков, в частности, миелинизации головного мозга у мышей данной линии мало изучены. В настоящей работе впервые проведена неинвазивная количественная оценка содержания миелина в мозге мышей линии CD-1, с помощью недавно разработанного МРТ метода быстрого картирования макромолекулярной протонной фракции (МПФ). Метод основан на явлении переноса намагниченности и позволяет количественно оценить долю протонов, находящихся в составе макромолекул, большую часть которых в мозге составляет миелин [1, 2]. Метод МПФ валидирован на грызунах, показана высокая корреляция МПФ с содержанием миелина [3–5]. Данные о половых различиях миелинизации будут полезными для исследований, использующих мышей линии CD-1 в качестве экспериментальных объектов, поскольку фактор пола должен учитываться при анализе результатов.

Экспериментальная часть

В эксперименте использовались 9 мышей (4 самца, 5 самок) линии CD-1 в возрасте 8 недель, которым проводили сканирование головного мозга на магнитно-резонансном томографе Bruker 11,7 Тл по протоколу МПФ. Оценка количественного содержания миелина осуществлялась на трехмерных картах МПФ с применением программы ImageJ 1.54f в

8 структурах белого и серого вещества: мозолистое тело, кора больших полушарий, каудопутамен, передняя комиссура, гиппокамп, внутренняя капсула, таламус и древовидное тело мозжечка. В мозолистом теле и коре больших полушарий измерения проводились в двух зонах: 1-я зона – область вблизи боковых желудочков, 2-я зона – область вблизи гиппокампа. Статистическая обработка данных выполнялась в программном обеспечении Statistica 10.0 с использованием анализа General Linear Models (GLM) и последующим post-hoc анализом Fisher LSD для прояснения значимости фактора. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Усредненные по всем структурам мозга значения МПФ оказались более высокими у самцов по сравнению с самками (11,9 % и 11,8 % соответственно), однако эти различия не были значимыми. Только в трех из восьми исследованных структур значения МПФ значимо отличались: передней комиссуре, каудопутамене и мозолистом теле. В передней комиссуре самцы имеют повышенный уровень МПФ относительно самок на 9,5 % ($p < 0,001$). Напротив, повышенное содержание миелина у самок относительно самцов обнаружено в каудопутамене на 6,5 % ($p < 0,001$) и мозолистом теле на 0,8 % у ($p < 0,01$) (рис. 1). В коре больших полушарий, гиппокампе, внутренней капсуле, таламусе и древовидном теле мозжечка значимых межполовых различий МПФ не обнаружено.

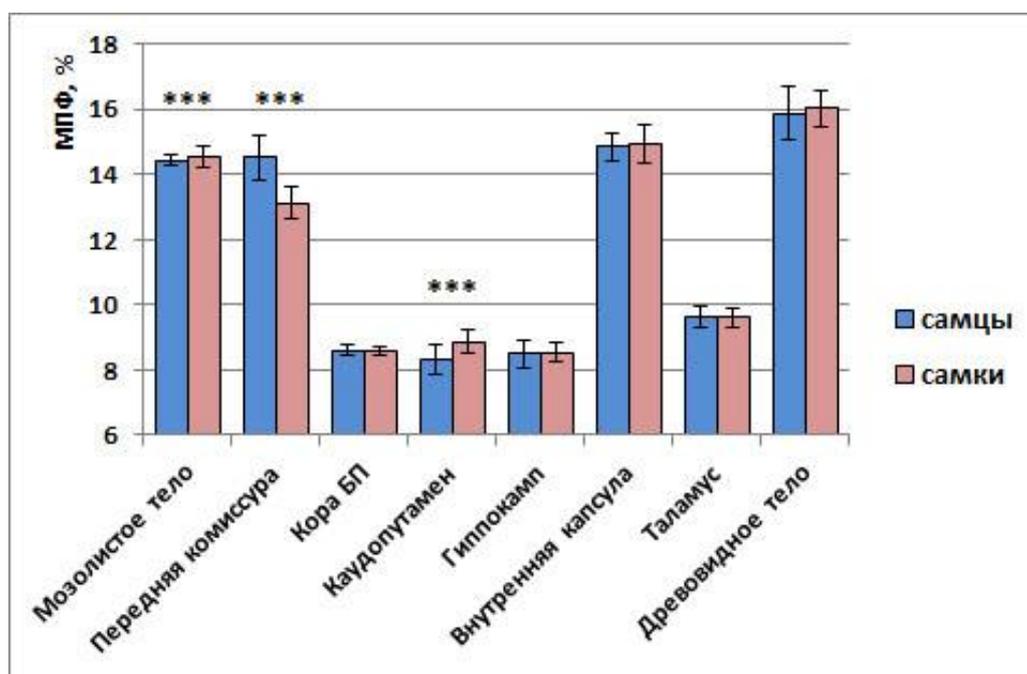


Рис. 1. Значения МПФ самцов и самок мышей CD-1 в различных структурах мозга. Значимые различия между самцами и самками: *** – $p < 0,001$

В мозолистом теле результаты отличаются в зависимости от исследуемой зоны: в расположенной ростральнее зоне вблизи боковых желудочков, МПФ на 3 % выше у самок ($p < 0,001$), а в расположенной каудальнее зоне вблизи гиппокампа МПФ на 1,3 % выше у самцов ($p < 0,05$) (рис. 2). Для коры больших полушарий такой закономерности не обнаружено.

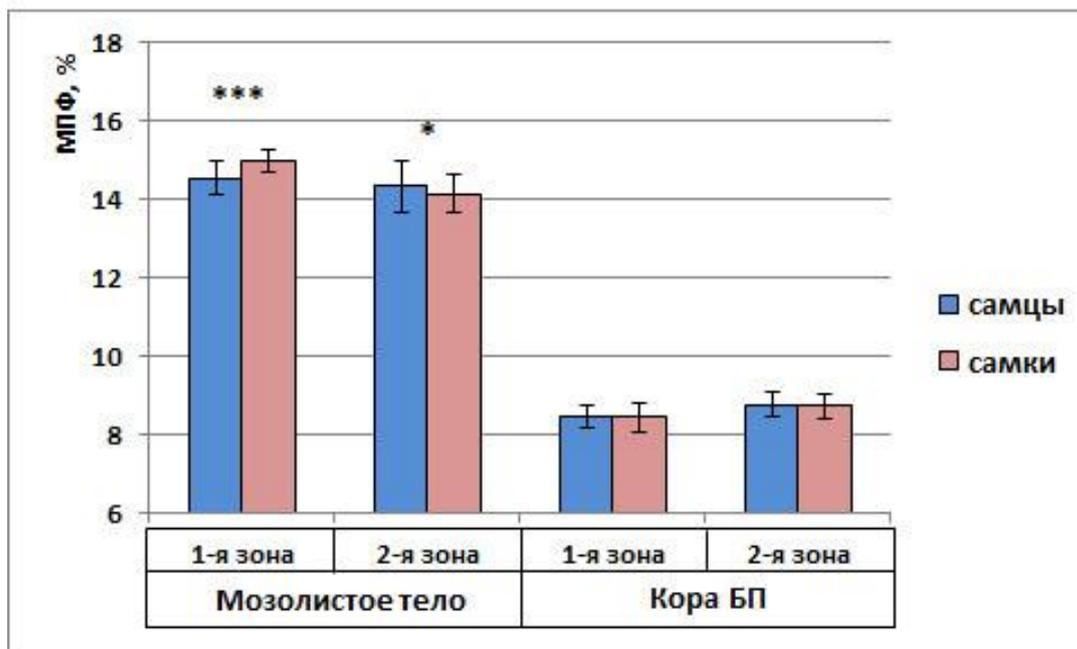


Рис. 2. МПФ в мозолистом теле и коре больших полушарий у самцов и самок. Значимые различия между самцами и самками: * – $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$

Заключение

В результате проведенного исследования значимые различия уровня МПФ между самцами и самками у мышей линии CD-1 не обнаружены для большинства изученных структур мозга, за исключением передней комиссуры, каудопутамена и мозолистого тела. Однако и в этих структурах не наблюдается однозначно более высокого содержания миелина у самцов или самок. Выявленные нами половые различия миелинизации отдельных регионов мозга требуют дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Yarnykh, V.L. Fast macromolecular proton fraction mapping from a single off-resonance magnetization transfer measurement // *Magnetic Resonance in Medicine*. – 2012. – Vol. 68, № 1. – P. 166–178.
2. Yarnykh, V.L., Tartaglione E.V., Ioannou G.N. Fast macromolecular proton fraction mapping of the human liver in vivo for quantitative assessment of hepatic fibrosis // *NMR in Biomedicine*. – 2015. – Vol. 28, № 12. – P. 1716–1725.
3. Khodanovich M.Y., Kisel A.A., Akulov A.E. et al. Quantitative assessment of demyelination in ischemic stroke in vivo using macromolecular proton fraction mapping // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2018. – Vol. 38, № 5. – P. 919–931.
4. Khodanovich M., Pishchelko A., Glazacheva V. et al. Quantitative imaging of white and gray matter remyelination in the cuprizone demyelination model using the macromolecular proton fraction // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, № 10. – P. 1204.
5. Underhill H.R., Rostomily R.C., Mikheev A.M. et al. Fast bound pool fraction imaging of the in vivo rat brain: Association with myelin content and validation in the C6 glioma model // *NeuroImage*. – 2011. – Vol. 54, № 3. – P. 2052–2065.

УДК 581.1

Полив растений ячменя раствором мелатонина для повышения засухоустойчивости

М.Н. Сергеева, Е.Д. Данилова

Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: mereiile214@gmail.com

Watering of barley plants with melatonin solution to increase drought resistance

M.N. Sergeeva, E.D. Danilova

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

E-mail: mereiile214@gmail.com

Abstract. *The effect of melatonin on physiological parameters (growth, content of the main photosynthetic pigments, lipid peroxidation, osmotic potential) of barley plants against drought stress was studied. The protective effect of melatonin is based on its ability to reduce the intensity of oxidative stress by maintaining the level of carotenoids. The data obtained indicate the possibility of using melatonin as a substance that increases the resistance of plants to subsequent drought.*

Key words: *Melatonin, drought, barley, lipid peroxidation, photosynthetic pigments.*

Введение

В условиях окружающей среды растения часто подвергаются абиотическим стрессам, например, нехватке доступной воды. Дефицит влаги является одной из основных причин снижения урожайности и ухудшения качества продукции сельскохозяйственных культур [1].

У растений, в зависимости от стадии развития и продолжительности стресса, засуха вызывает различные морфологические, физиологические, биохимические и молекулярные аномалии, приводящие к снижению роста и развития. Кроме того, водный дефицит повышает генерацию активных форм кислорода, что приводит к развитию окислительного стресса [2]. Все вышеназванные негативные эффекты действия засухи значительно снижают продуктивность растений, что делает необходимым понимание механизмов устойчивости.

Одним из перспективных способов защиты от негативного воздействия абиотических факторов является использование таких регуляторов роста как фитогормоны, которые известны своей способностью повышать стрессоустойчивость растений. Особый интерес представляет фитомелатонин – плейотропная молекула индольной природы, которую ряд исследователей относят к фитогормонам [3]. Мелатонин, благодаря своим антиоксидантным свойствам и участию в регуляции процессов фотосинтеза способен повышать устойчивость растений к стрессу, вызванному засухой [4]. Однако, физиологический эффект мелатонина варьируется в зависимости от вида растения, концентрации и способа его использования.

Целью данного исследования была оценка эффективности однократного полива растений ячменя раствором мелатонина для повышения их засухоустойчивости.

Экспериментальная часть

Исследования были проведены на растениях ярового ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта Биом. Это однолетнее травянистое растение, вид рода Ячмень (*Hordeum*) семейства Злаки (*Poaceae*).

Семена ячменя сорта Биом стерилизовали спиртовым раствором и 48 часов стратифицировали при температуре 4°C. Далее семена проращивали в емкостях с дистиллированной водой в фитотроне с 16-ти часовым фотопериодом в течение 3х суток при температуре 22 °C.

Далее семена распределяли в сосуды с равным объемом почвенного субстрата согласно 4 вариантам: «контроль», «засуха», «мелатонин», «мелатонин + засуха». В каждом сосуде находилось по 10 семян. В первые 5 суток проростки ячменя всех вариантов поливали

дистиллированной водой в равной степени; на 7 сутки проводился полив раствором мелатонина в концентрации 10 мкМ вариантов «мелатонин» и «мелатонин + засуха». Условия засухи моделировали путем отмены полива с 10х суток эксперимента. Через 20 суток после переноса семян в почву была зафиксирована биомасса надземной части растений. Материал для исследования физиологических показателей фиксировали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C .

Сырую и сухую биомассу растительного материала оценивали гравиметрическим методом с помощью аналитических весов Sartorius CP 622 (класс точности II высокий) (Германия). Сухую массу определяли после фиксации материала и его высушивания до постоянного веса. Содержание воды (% от сырой массы) рассчитывали, исходя из отношения разности сырой и сухой биомасс, отнесенной к сырой массе.

Для определения содержания фотосинтетических пигментов навеску листьев (70–80 мг) растирали в жидком азоте и вносили в пробирку с 96 %-ым этанолом (1,5 мл), вортексировали, центрифугировали при 10000 g 10 минут, надосадочную жидкость аккуратно переносили в конические пробирки. Данную экстракцию производили трижды, пробирки держали в темноте. Доводили количество спирта во всех пробирках до одинакового объема (5 мл), перемешивали и измеряли оптическую плотность. Концентрацию фотосинтетических пигментов в растворе определяли согласно Lichtenthaler [5].

Величину перекисного окисления липидов (ПОЛ), свидетельствующую об уровне окислительного стресса, измеряли спектрофотометрическим методом по концентрации соединений, активных в реакции с тиобарбитуровой кислотой при нагревании (ТБК-АП) по Buege и Aust [6].

Осмотический потенциал клеточного экссудата растений ячменя определяли на криоскопическом осмометре Osmomat 030 («Gonotec», Германия). При этом осмотический потенциал оценивали по точке замерзания клеточного сока. Величину осмотического потенциала выражали в МПа.

Результаты

Результаты экспериментов показали, что засуха ингибировала накопление сырой массы растений ячменя на 37 % относительно контрольного варианта. Полив растений раствором мелатонина в стрессовых условиях способствовал увеличению сырой массы растений на 27 % относительно стрессового варианта, однако не восстанавливал накопление биомассы до контрольного уровня. Сухая масса надземной части растений, подвергшихся стрессу, уменьшалась на 26 % относительно контрольных растений, в то время как обработка мелатонином способствовала сохранению данного показателя, поскольку снижение сухой биомассы составило всего 7 % относительно контроля.

Растения ячменя в условиях засухи имели меньшее относительное содержание воды, чем в оптимальных условиях на 11 %, однако обработка мелатонином способствовала повышению относительного содержания воды на 5 % по сравнению со стрессовым вариантом, что приближало данный показатель к контрольному значению.

Для сохранения водного статуса тканей растений в стрессовых условиях важным является понижение их осмотического потенциала до уровня, обеспечивающего поток воды из среды в клетки корня. Исходя из полученных данных, осмотический потенциал клеточного экссудата листьев ячменя в контрольном варианте составлял $-0,89$ МПа. Под действием почвенной засухи осмотический потенциал клеточного содержимого листьев снижался на 25 %. Полив растений раствором мелатонина в стрессовых условиях повышал величину осмотического потенциала листьев ячменя на 14 % относительно растений в варианте с засухой, но без мелатонина.

Негативное действие засухи отразилось так же на содержании хлорофиллов *a* и *b* в листьях ячменя, которое снизилось на 7–10 % относительно контроля.

Засуха повышала содержание каротиноидов на 64 %, а мелатонин в отсутствии стресса на 32 %, по сравнению с контрольным вариантом.

Экзогенный мелатонин с последующим действием засухи увеличивал содержание каротиноидов на 33 % относительно стрессового варианта и практически в два раза относительно контрольных растений. Данная тенденция повышения уровня каротиноидов, как неферментативных антиоксидантов, является одним из защитных механизмов действия мелатонина при влиянии стрессовых факторов, так как каротиноиды нейтрализуют синглетный кислород и подавляют образование свободных радикалов [7].

В отсутствие стрессового фактора полив ячменя раствором мелатонина понижал количество ТБК-АП на 15 % относительно контроля. В пробах растений, выращенных в условиях засухи, количество ТБК-АП в два раза превышало контрольные значения. Обработка растений раствором мелатонина с последующей засухой снижала величину ПОЛ по сравнению с вариантом «засуха» без мелатонина на 77 %.

Заключение

Таким образом, изучено влияние экзогенного мелатонина на растения ячменя на фоне действия почвенной засухи. Показано, что засуха негативно влияет на рост ячменя, что доказывается снижением надземной массы растений. Потеря массы растениями происходит не только из-за снижения содержания влаги, но и из-за торможения роста в стрессовых условиях, о чем свидетельствует ингибирование сухой массы растений.

Дефицит влаги вызывает окислительный стресс, что доказано усилением ПОЛ в растениях ячменя. Однократный полив растений ячменя раствором мелатонина снижал уровень окислительного стресса, что показано по количеству ТБК-АП. Падение уровня ПОЛ объяснимо реализацией антиоксидантного эффекта мелатонина.

Одним из возможных защитных механизмов действия мелатонина на растения ячменя можно считать повышение количества антиоксидантных веществ, в том числе каротиноидов.

Исследование поддержано Российским научным фондом (РНФ, проект № 23-44-10019).

Список литературы

1. Dos Santos T.B. et al. Physiological responses to drought, salinity, and heat stress in plants: a review // *Stresses*. – 2022. – V. 2, № 1. – P. 113–135.
2. Nyaupane S. et al. Drought stress effect, tolerance, and management in wheat—a review // *Cogent Food & Agriculture*. – 2024. – V. 10, № 1. – P. 2296094.
3. Arnao M.B., Hernández-Ruiz J. Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator? // *Trends in Plant Science*. – 2019. – V. 24, № 1. – P. 38–48.
4. Sharma P. et al. Melatonin as plant growth regulator in sustainable agriculture // *Scientia Horticulturae*. – 2024. – V. 323. – P. 112421.
5. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // *Plant Cell Membranes*. – London, 1987. – P. 350–382.
6. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // *Methods in Enzymology*. – 1978. – Vol. 52. – P. 302–310.
7. Luo F., Cheng S.C., Cai J.H. et al. Chlorophyll degradation and carotenoid biosynthetic pathways: Gene expression and pigment content in broccoli during yellowing // *Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 297. – P. 1–9.

УДК 575.112

**Влияние химиотерапии на транскрипционный профиль моноцитов
больных раком яичников****С.А. Сяркина, П.С. Ямщиков^{1,2}, М.А. Ракина¹**

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

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050²Томский национальный исследовательский медицинский центр, НИИ онкологии,
Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634050

E-mail: sveta.syarkina@mail.ru

**The effect of chemotherapy on the transcriptional profile of monocytes
in patients with ovarian cancer****S.A. Siarkina, P.S. Iamshchikov^{1,2}, M.A. Rakina¹**

Scientific Supervisor: Ph.D. I.V. Larionova

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050²Tomsk National Research Medical Center, RI Cancer, Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634050

E-mail: sveta.syarkina@mail.ru

Abstract. Ovarian cancer (OC) is one of the most common gynecological cancers. OC is often diagnosed at a late stage. Despite the cytoreductive effect of chemotherapy, OC relapses in more than 70 % of patients, which indicates an unsustainable anti-tumor effect of concurrent chemotherapy. Tumor-associated macrophages (TAMs) play a key role in the tumor microenvironment and can mediate tumor response to chemotherapy. Monocytes are the main plastic source for TAMs. Thus, studying monocytes and their reprogramming could leverage improvements to concurrent chemotherapy. We applied bulk RNA sequencing to obtain a transcriptional profile of monocytes of OC patients receiving neoadjuvant chemotherapy (NACT). The differential expression analysis revealed that under the influence of platinum-based NACT, genes related to antiviral immunity and tumor progression are activated in monocytes, while patients without NACT exhibit increased expression of genes associated with the suppression of cell differentiation and regulation of the immune response.

Key words: ovarian cancer, neoadjuvant chemotherapy, monocytes, RNA-seq, bioinformatics.

Введение

Рак яичников (РЯ) – распространенное женское онкологическое заболевание, занимающее седьмое место по заболеваемости и шестое место по смертности от онкологических заболеваний [1]. Несмотря на циторедуктивный эффект химиотерапии у пациентов часто возникает лекарственная устойчивость и развивается рецидив. Опухолевое микроокружение играет важную роль в развитии и росте опухоли. Опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) являются ключевыми клетками врожденного иммунитета в опухолевом микроокружении и активно вовлекаются в ответ опухоли на химиотерапию. Моноциты являются основным пластическим ресурсом макрофагов в опухоли. Химиотерапия и факторы, вырабатываемые опухолью, системно влияют на состояние моноцитов периферической крови до их миграции в опухоль [2]. Анализ фенотипа моноцитов под влиянием опухоли и противоопухолевого лечения является важным в понимании их перепрограммирования в про-опухолевые или противоопухолевые ОАМ [3]. Является актуальным поиск терапевтических мишеней и разработка стратегии перепрограммирования моноцитов и ОАМ для усиления противоопухолевого эффекта терапии.

Экспериментальная часть

Анализировали моноциты периферической крови больных диссеминированным раком яичников (III стадия), получавших неoadъювантную химиотерапию (3 образца) и не получавших ее (3 образца). Для получения транскрипционного профиля проводили тотальное РНК-секвенирование. Картирование прочтений на геном проводили в программе STAR [4]. Данные о дифференциальной экспрессии генов между двумя экспериментальными группами получали при помощи программного пакета DESeq2 [5] в среде R. При помощи инструмента проводили обогащение по функциональным путям методом GSEA. Использовали базы данных KEGG и GO.

Результаты

Путем анализа дифференциальной экспрессии выявили дифференциально экспрессирующиеся гены между исследуемыми группами (рис. 1).

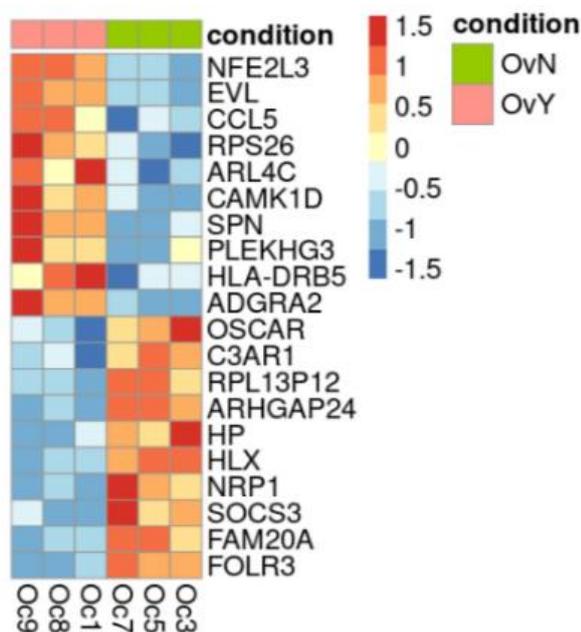


Рис. 1. Топ 20 дифференциально экспрессирующихся генов, где OvN – группа без НАХТ, OvY – группа с НАХТ

Видно, что на транскрипционном уровне в моноцитах под действием платиносодержащей химиотерапии наблюдается активация генов CCL5, CAMK1D, HLA-DRB5, ADGRA2, связанных с противовирусным иммунитетом, хемотаксисом Т-клеток, эозинофилов и базофилов, а также с опухолевой прогрессией. В группе больных, которым не проводилась НАХТ дифференциальная экспрессия была повышена в генах HLX, SOCS3, FOLR3, связанных с подавлением дифференцировки клеток, регуляцией иммунного ответа, а также множества сигнальных путей.

Полученный набор дифференциально экспрессирующихся генов использовали для анализа функциональных путей в исследуемых группах (рис. 2).

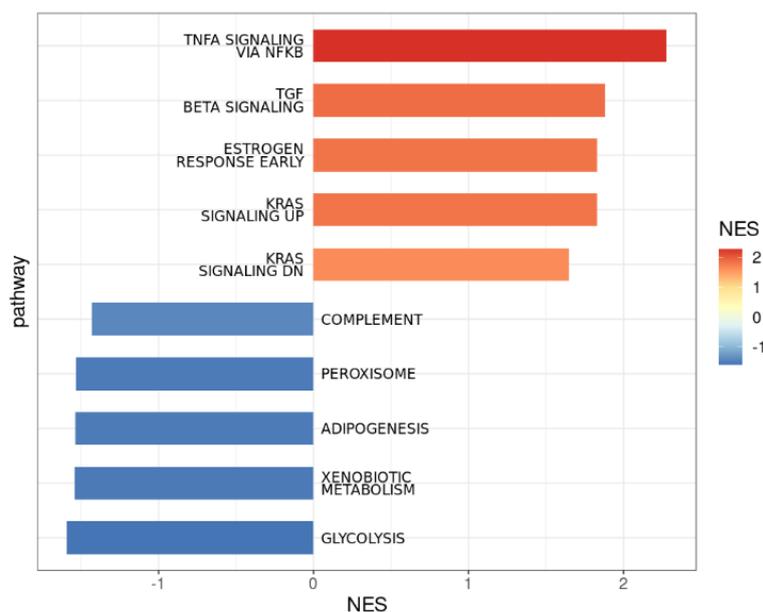


Рис. 2. Топ сигнальных путей, где $NES < 0$ – образцы без НАХТ, $NES > 0$ – образцы с НАХТ.
NES – степень насыщенности

Функциональные пути, активированные в моноцитах под действием карбоплатина, связаны преимущественно с активностью TNF α и TGF β сигналинга, увеличением KRAS сигнального пути и ранней реакцией на эстроген. Функциональные пути в моноцитах больных, которым не проводилась НАХТ, связаны с активацией комплемента, гликолиза, пероксисомы, участвующей в окислительном катаболизме жирных кислот, метаболизма ксенобиотиков, которые играют важную роль в активности и детоксикации канцерогенов.

Заключение

Полученные результаты показывают у больных, получавших НАХТ, активацию генов и функциональных путей TNF α и TGF β сигналинга, а у пациентов без НАХТ – путей с метаболическими процессами и детоксикацией канцерогенов. Таргетинг выявленных функциональных путей может способствовать улучшению эффекта НАХТ у больных диссеминированным РЯ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ №21-75-10021.

Список литературы

1. Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Soerjomataram I., Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA Cancer J Clin. – 2024. – Vol. 74 (3). – P. 229–263.
2. Larionova I., Iamshchikov P., Kazakova A., Rakina M., et al. Platinum-based chemotherapy promotes antigen presenting potential in monocytes of patients with high-grade serous ovarian carcinoma // Front Immunol. – 2024. – Vol. 15. – P. 1414716.
3. Kzhyshkowska J., Shen J., Larionova I. Targeting of TAMs: can we be more clever than cancer cells? // Cell Mol Immunol. – 2024. – Vol. 21(12). – P. 1376–1409.
4. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner // Bioinformatics. – 2013. – Vol. 29(1). – P. 15–21.
5. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // Genome Biol. – 2014. – Vol. 15(12). – P. 550.
6. Alexey AS. An Algorithm for Fast Preranked Gene Set Enrichment Analysis Using Cumulative Statistic Calculation // bioRxiv. – 2016. – P. 060012.

УДК 576.08

Влияние длительной инсулинотерапии на интенсивность липолиза в изолированных адипоцитах крыс с экспериментальным стрептозоцин-индуцированным сахарным диабетом 1 типа

А.А. Уфандеев, Е.Е. Буйко

Научный руководитель: профессор РАН, д.м.н. Е.В. Удут

Научный консультант: доцент, к.б.н. В.В. Иванов

Сибирский государственный медицинский университет

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

E-mail: ufandeev@gmail.com

Effect of long-term insulin therapy on the intensity of lipolysis in isolated adipocytes of rats with experimental streptozocin-induced type 1 diabetes mellitus

A.A. Ufandeev, E.E. Buyko

Scientific Supervisor: Prof., Dr. E.V. Udut

Scientific Advisor: Ph.D. V.V. Ivanov

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

E-mail: ufandeev@gmail.com

Abstract. *The aim of this study was to evaluate the effect of long-term insulin therapy on the intensity of lipolysis in isolated adipocytes of rats with experimental streptozocin-induced type 1 diabetes mellitus. We have shown that long-term insulin therapy maintaining normoglycaemia in rats with experimental type 1 diabetes mellitus increased the intensity of basal lipolysis in isolated adipocytes of epididymal adipose tissue and reduced the antilipolytic effect of insulin on isoproterenol-stimulated lipolysis.*

Key words: *type 1 diabetes, insulin resistance, lipolysis, rats.*

Введение

Сахарный диабет 1 типа – потенциально опасное для жизни мультифакторное аутоиммунное заболевание. Начиная с 1950-х годов, заболеваемость сахарным диабетом 1 типа растет во всем мире, причем за последние 30 лет она увеличивалась в среднем на 3–4 % в год. Особенно высок темп роста заболеваемости у детей, и этот тревожный сигнал является причиной согласованных исследовательских усилий по улучшению методов диагностики и лечения, а также поиску новых сведений о патогенезе заболевания [1].

Нарушение секреции инсулина, также как и состояние инсулинорезистентности, приводит к изменению не только углеводного, но и белкового и жирового обмена [2]. Имеются данные, свидетельствующие о том, что гиперлипидемия в сочетании с сахарным диабетом 1 типа увеличивает риск развития следующих заболеваний сердечно-сосудистой системы: атеросклеротическое поражение артерий, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, хроническая сердечная недостаточность [3–5].

Одной из важных функций инсулина наряду с стимуляцией транспорта глюкозы в инсулин-чувствительные ткани, в том числе жировую, является ингибирование липолиза. Подавление инсулином липолиза в адипоцитах является основным действием, посредством которого он регулирует системный метаболизм [6].

Цель исследования – оценить влияние длительной инсулинотерапии на интенсивность липолиза в изолированных адипоцитах крыс с экспериментальным стрептозоцин-индуцированным сахарным диабетом 1 типа.

Экспериментальная часть

Экспериментальную модель сахарного диабета 1 типа воспроизводили на 10 крысах-самцах линии Wistar массой 390 ± 25 г, полученных из ФГБУ НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск). Протоколы исследования были одобрены комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных ЦДИ ЦНИЛ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заключение №04/21 от 09.04.2021).

Сахарный диабет 1 типа моделировали ежедневной внутрибрюшинной инъекцией стрептозотоцина (Sigma Aldrich, США) в дозе 25 мг/кг в течение 5 дней [7]. Животным контрольной группы ($n = 10$) в течение 5 дней вводили носитель (цитратный буфер) в эквивалентном объёме.

После подтверждения развития стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета 1 типа животным опытной группы была проведена длительная инсулинотерапия в течение 3,5 месяцев путём ежедневного подкожного введения раствора инсулин-изофан, человеческого генно-инженерного инсулина средней продолжительности действия в дозах, поддерживающих нормогликемию (концентрация глюкозы в крови крыс в диапазоне от 5,0 до 7,7 ммоль/л считалась нормогликемическим состоянием крови и контролировалась 2 раза в день перед введением инсулина).

Выделение адипоцитов из эпидидимальной жировой ткани осуществлялось с использованием классического метода М. Rodbell [8]. Полученные после фотографирования изображения адипоцитов обрабатывались в программе Image J (Wayne Rasband, USA). Далее проводилось определение диаметра 200 случайно выбранных адипоцитов в каждой пробе.

Интенсивность липолиза в изолированных адипоцитах оценивали по выходу в инкубационную среду глицерола. Содержание глицерола в инкубационной среде клеток определяли ферментативным колориметрическим методом с использованием Free Glycerol Reagent (Sigma, США).

Для оценки спонтанного (базального) липолиза 1 мл суспензии адипоцитов с содержанием 1×10^6 клеток/мл и 0,5 мл буфера (10 мМ HEPES буфер, раствор Кребса-Рингера, 2 % БСА без жирных кислот, 5 мМ раствора глюкозы), инкубировали в CO₂-инкубаторе («Sanyo», Япония) в течение 2 ч при 37 °С. В 96-луночные плашки отбирали 50 мкл пробы и добавляли 150 мкл Free Glycerol Reagent и инкубировали 25 мин при 25 °С. Оптическая плотность раствора измерялась с использованием планшетного спектрофотометра Tecan Sunrise при длине волны 540 нм. Содержание глицерола рассчитывали по калибровочной кривой в диапазоне концентраций от 0 до 200 мкг/мл.

Для оценки стимулированного липолиза содержание глицерола определяли в адипоцитах, которые предварительно инкубировали в течение 2 ч в присутствии 10 мкл изопротеренола (агонист β_2 -адренорецепторов, «Sigma», St. Louis, MO) в конечной концентрации 10 мкМ и/или 10 мкЕ/мл инсулина («Sigma», St. Louis, MO) согласно методике, приведённой выше.

Экспериментальные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения STATISTICA 8.0 (StatSoft, США). Проверку на нормальность распределения значений осуществляли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Анализ статистической значимости различий между выборками выполняли при помощи t-критерия Стьюдента (в случае нормального распределения) и U-критерия Манна-Уитни (в случае распределения отличного от нормального), статистически значимым считали результат при $p < 0,05$.

Результаты

Средний диаметр адипоцитов эпидидимальной жировой ткани у крыс с экспериментальным стрептозотин-индуцированным сахарным диабетом 1 типа на фоне длительной инсулинотерапии составлял $80,5 \pm 8,6$ мкм, что на 11,5 % ($p = 0,03$) меньше этого показателя у животных контрольной группы ($90,9 \pm 13,0$ мкм).

Интенсивность базального липолиза *in vitro* в адипоцитах оценивали по выходу глицерола в среду инкубации клеток за 2 часа. Концентрация глицерола в среде при инкубации изолированных адипоцитов контрольных крыс составила $69,7 \pm 29,1$ мкг/100мкл упакованных клеток. При инкубации жировых клеток, полученных от животных с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа при длительной инсулинотерапии – $118,4 \pm 32,5$ мкг/100мкл упакованных клеток. Таким образом, длительная инсулинотерапия у крыс с сахарным диабетом 1 типа приводит к повышению в 1,7 раза ($p = 0,0012$) активности нерегулируемого гормонами базального липолиза в изолированных из эпидидимальной жировой ткани адипоцитах.

Добавление инсулина в инкубационную среду не уменьшало интенсивность базального липолиза, что свидетельствует о снижении антилиполитического действия инсулина в адипоцитах крыс на фоне длительной инсулинотерапии. Агонист β -блокатора изопротеренол повышал интенсивность липолиза в адипоцитах крыс контрольной и опытной групп. Инсулин снижал интенсивность стимулированного изопротеренолом липолиза в адипоцитах крыс контрольной группы на 29,5 % ($p < 0,001$). В тоже время, гормон не оказывал существенного влияния ($p = 0,2884$) на индуцированный агонистом β -блокатора выход глицерола в среду при инкубации адипоцитов крыс с сахарным диабетом 1 типа после длительной инсулинотерапии.

Заключение

В проведённом исследовании показано, что при длительной инсулинотерапии, поддерживающей нормогликемию у крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа, в изолированных адипоцитах эпидидимальной жировой ткани повышалась интенсивность базального липолиза и снижено антилиполитическое действие инсулина на стимулированный изопротеренолом липолиз.

Список литературы

1. Akil A.S., Yassin E., Al-Maraghi A., Aliyev E., Al-Malki K., Fakhro K.A. Diagnosis and treatment of type 1 diabetes at the dawn of the personalized medicine era // Journal of Translational Medicine. – 2021. – Vol. 19, № 1. – P. 1–19.
2. Peterkova V.A., Shestakova M.V., Bezlepkina O.B., Laptev D.N., Kuraeva T.L., Mayorov A.Y., Khramova E.B. Diabetes mellitus type 1 in childhood // Diabetes mellitus. – 2020. – Vol. 23, № 1S. – P. 4–40.
3. Htay T., Soe K., Lopez-Perez A., Doan A.H., Romagosa M.A., Aung, K. Mortality and cardiovascular disease in type 1 and type 2 diabetes // Current cardiology reports. – 2019. – Vol. 21. – P. 1–7.
4. Cai X., Li J., Cai W., Chen C., Ma J., Xie Z., Zhao J. Meta-analysis of type 1 diabetes mellitus and risk of cardiovascular disease // Journal of Diabetes and its Complications. – 2021. – Vol. 35, № 4. – P. 107833.
5. Swasey K.K., Orchard T.J., Costacou T. Trends in cardiovascular risk factor management in type 1 diabetes by sex // Journal of Diabetes and its Complications. – 2018. – Vol. 32, № 4. – P. 411–417.
6. Watt M.J., et al. The liver as an endocrine organ—linking NAFLD and insulin resistance // Endocrine reviews. – 2019. – Vol. 40, № 5. – P. 1367–1393.
7. Wu K.K., Huan Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats // Current Protocols in pharmacology. – 2008. – Vol. 5. – P. 5.47 (1–14).
8. Cree-Green M., et al. Metformin improves peripheral insulin sensitivity in youth with type 1 diabetes // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2019. – Vol. 104, № 8. – P. 3265–3278.

УДК 612.118.221.3

Изучение некоторых биологических свойств семейства кукурбит[n]уриловД.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

A study of some biological properties of the cucurbit[n]uril familyD.A. Fedorishin

Scientific Supervisor: Prof., Dr. A.A. Bakibaev
Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050
E-mail: strix187@yandex.ru

Abstract. *Within the framework of this research the hemolytic activity and cytotoxicity of cucurbit[n]urils (CB[6-8]) and zoledronic acid were evaluated. In the process of project implementation it was possible to select optimal concentrations of the research objects, which at the next stage will be used to create supramolecules based on cucurbit[n]urils with zoledronic acid molecules included in the cavity.*

Key words: *cucurbit[6]uril, cucurbit[7]uril, cucurbit[8]uril, zoledronic acid, hemocompatibility, cytotoxicity.*

Введение

Кукурбит[n]урилы (CB[n]) представляют собой класс макроциклических соединений, образованных повторяющимися гликолурильными фрагментами, связанными метиленовыми мостиками. Наиболее изученными представителями данного семейства являются кукурбит[6]урил (CB[6]), кукурбит[7]урил (CB[7]) и кукурбит[8]урил (CB[8]), где индекс в квадратных скобках соответствует количеству мономерных звеньев в структуре макроцикла. Характерной особенностью CB[n] является наличие гидрофобной полости, способной к селективному включению молекул гостей за счет нековалентных взаимодействий, включая гидрофобные эффекты, водородные связи и электростатические взаимодействия. Благодаря этим свойствам кукурбит[n]урилы рассматриваются в качестве перспективных носителей для направленной доставки биологически активных соединений [1].

Золедроновая кислота относится к группе азотсодержащих бисфосфонатов и применяется в терапии патологий, сопровождающихся повышенной резорбцией костной ткани. Механизм ее действия основан на ингибировании активности остеокластов за счет подавления мевалонатного пути, что приводит к снижению костной деградаци и повышению минеральной плотности кости. Высокая аффинность золедроновой кислоты к гидроксипатиту костной ткани обеспечивает ее избирательное накопление в участках активного ремоделирования, что делает данный препарат эффективным средством для лечения остеопороза и костных метастазов [2].

Комбинация CB[n] и золедроновой кислоты открывает перспективы для разработки супрамолекулярных систем направленной доставки, позволяющих повысить биодоступность и снизить системную токсичность бисфосфонатов. Однако ключевым требованием к подобным комплексам является их биосовместимость и минимальное влияние на физиологические процессы в организме. Целью данного исследования являлось установление общей цитотоксичности и подбор оптимальных концентраций объектов исследования, которые на следующем этапе будут использованы для создания супрамолекул на основе кукурбит[n]урилов (n = 6, 7, 8) с включенными в полость молекулами золедроновой кислоты.

Экспериментальная часть

В рамках данного исследования проведено изучение гемосовместимости и цитотоксичности кукурбит[*n*]урилов ($n = 6, 7, 8$) и золедроновой кислоты (Sigma-Aldrich, USA). Для этого изучена их гемосовместимость на эритроцитах периферической крови человека, а также цитотоксичность на клеточной линии NIH/3T3 методом реакции с AlamarBlue. Для оценки гемосовместимости образцов использовалась цельная гемостатированная кровь здорового донора. Оценка гемосовместимости проводилась по стандартной методике, предусмотренной ISO 10993-4:2017 [3]. Линия NIH/3T3 представляет собой делящиеся фибробласты мыши. Культивирование клеточных линий осуществлялось в соответствии с рекомендациями производителя. Для исследования образцы золедроновой кислоты были взяты в концентрациях 1×10^{-8} М (Zol-8), 1×10^{-9} М (Zol-9) и 1×10^{-10} М (Zol-10), а кукурбит[*n*]урилы ($n = 6, 7, 8$) – в концентрациях 1×10^{-3} М (CB[6, 7, 8]-3, 1×10^{-4} М (CB[6, 7, 8]-4) и 1×10^{-5} М (CB[6, 7, 8]-5). Кукурбит[*n*]урилы были синтезированы в лаборатории органического синтеза ХФ НИ ТГУ.

Для исследования влияния образцов на жизнеспособность клеток был использован тест с AlamarBlue. Проведение теста с AlamarBlue осуществлялось в соответствии с рекомендациями производителя.

Результаты

В результате исследования гемосовместимости установлено, что образец CB[7] в концентрации 1×10^{-4} М проявил некоторую гемолитическую активность, но статистически достоверных различий между процентом гемолиза данного образца и отрицательным контролем (CTRL 0 %) не установлено ($p > 0,05$). Остальные образцы не проявили гемолитической активности. Можно отметить, что уровень гемолиза контактирующих с внутренней средой организма биоматериалов не должен превышать 5 % [1]. Как следует из эксперимента, ни один изученный образец не превышал данный уровень. Поэтому можно заключить, что все образцы являются гемосовместимыми.

На следующем этапе исследования мы изучили цитотоксичность объектов исследования на клеточной линии NIH/3T3 (рис. 1).

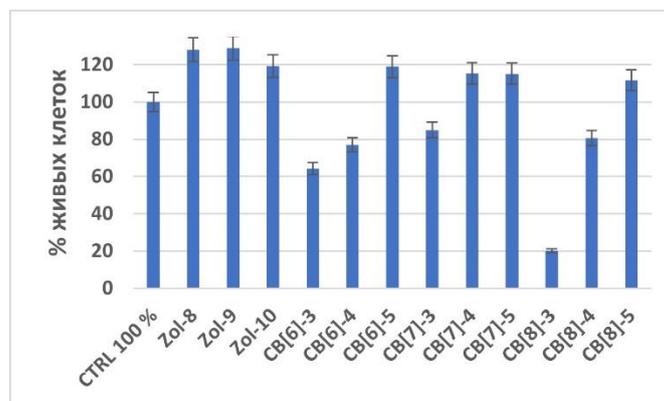


Рис. 1. Влияние объектов исследования на жизнеспособность клеток линии NIH/3T3
CTRL – контроль; Zol – золедроновая кислота; CB[6] – кукурбит[6]урил; CB[7] – кукурбит[7]урил;
CB[8] – кукурбит[8]урил

Как следует из данных Рисунка 1, образцы золедроновой кислоты в представленных в исследовании концентрациях не оказали токсического действия на клетки линии NIH/3T3. Количество живых клеток при этом увеличилось количество клеток на 28; 28 и 19 % соответственно ($p < 0,05$). При этом все образцы группы кукурбит[*n*]урилов, (CB[6, CB[7] и CB[8]) напротив, оказали цитотоксическое действие на клетки. Число живых клеток после инкубации с образцами CB[6]-3 и CB[6]-4 снизилось на 36 и 23 % соответственно ($p < 0,05$).

При этом после инкубации с образцом СВ[6]-5 число живых клеток увеличилось на 19 % ($p < 0,05$). Очевидно, что эта концентрация не вызывает токсических эффектов. Образцы группы СВ[7] проявили несколько меньшую токсичность, чем образцы группы СВ[6]. Число живых клеток после инкубации с образцом СВ[7]-3 уменьшилось на 15 %, а после инкубации с образцами СВ[7]-4 и СВ[7]-5 увеличилось на 15 % у обоих образцов ($p < 0,05$). Наибольшую токсичность проявили образцы группы СВ[8]. Число живых клеток после инкубации с образцами СВ[8]-3 и СВ[8]-4 уменьшилось на 80 и 19 % соответственно, а после инкубации с образцом СВ[8]-5 – увеличилось на 12 % ($p < 0,05$). Можно сделать вывод, что концентрация 1×10^{-5} моль/л является безопасной для клеток линии НИИ/ЗТЗ, что так же подтверждается визуально (рис. 2). Клетки под воздействием образцов в использованных концентрациях сохраняют свою морфологию и образуют конфлюэнтный монослой.

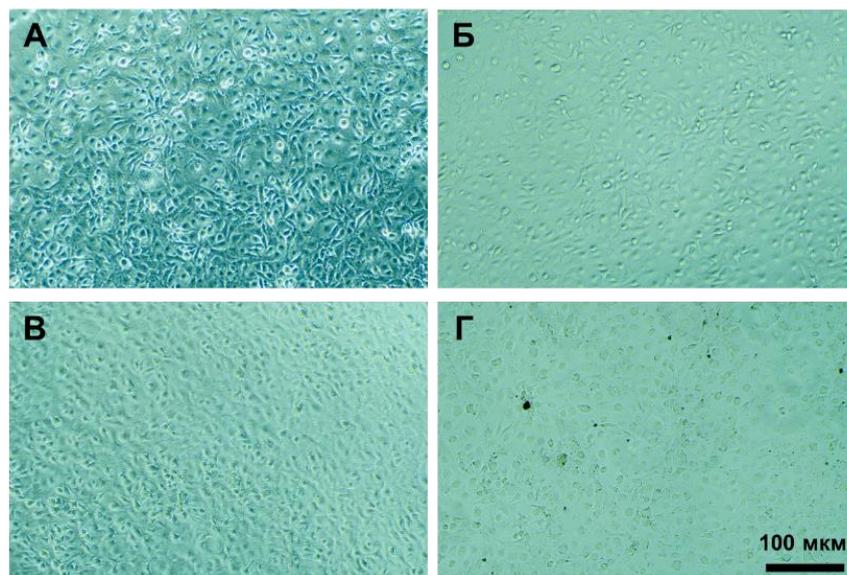


Рис. 2. Микрофотографии конфлюэнтного монослоя клеток линии НИИ/ЗТЗ после инкубации с образцами СВ[6], СВ[7] и СВ[8]. Масштаб – 100 мкм.

А – контроль; Б, В и Г – СВ[6], СВ[7] и СВ[8] в концентрации 1×10^{-5} моль/л соответственно

Заключение

В рамках выполнения данного исследования проведена оценка гемолитической активности и цитотоксичности кукурбит[н]урилов и золедроновой кислоты. В процессе выполнения проектов удалось осуществить подбор оптимальных концентраций объектов исследования, которые на следующем этапе будут использованы для создания супрамолекул на основе кукурбит[н]урилов с включенными в полость молекулами золедроновой кислоты. Также можно отметить, что создание супрамолекулярных конструкций на основе кукурбит[н]урилов и золедроновой кислоты является стратегической задачей для дизайнера систем доставки лекарств.

Исследование поддержано грантом РФФ 24-43-20044.

Список литературы

1. Ukhov A., Fedorishin D., Gubankov A., Kurzina I., et al. Development of New Composite Materials by Modifying the Surface of Porous Hydroxyapatite Using Cucurbit[n]urils // *Materials*. – 2024. – Vol. 17, № 9. – Art. num. 2041.
2. Letizia M., Tomasello A.J., Mangano D.A. et al. Osteoporosis in Systemic Mastocytosis: A Scoping Review // *Medicina*. – 2024. – Vol. 11, № 60. – Art. num. 1752.
3. ISO 10993-4:2017. Biological evaluation of medical devices – Part 4: Selection of tests for interactions with blood // *Technical Committee*. Vol. ISO/TC 194. P. 69.

УДК 615.21

**Перспективные противопаркинсонические агенты PA-198-1 и PA-198-2
и их влияние на холинергическую систему у модельных животных**

А.Ю. Филиппова, А.В. Подтуркина

Научный руководитель: д.б.н. А.В. Павлова

Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН
Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д. 9, 630090

E-mail: filippova@nioch.nsc.ru

**Prospective antiparkinsonian agents PA-198-1 and PA-198-2
and their effects on the cholinergic system in model animals**

A.Yu. Filippova, A.V. Podturkina

Scientific Supervisor: Dr. A.V. Pavlova

N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Russia, Novosibirsk, Lavrentiev str.,
9, 630090

E-mail: filippova@nioch.nsc.ru

Abstract. *In the present study, we have investigated isomeric compounds PA-198-1 and PA-198-2 derived from monoterpene diol. PA-198-1 and PA-198-2 at doses 20 mg/kg proved to have antiparkinsonian properties. PA-198-2 mediates its effect through nicotinic acetylcholinergic receptors, whereas PA-198-1 does not.*

Key words: *Parkinson's disease, neuroprotection, antiparkinsonian agents.*

Введение

Болезнь Паркинсона является хроническим прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, характеризующимся ранней выраженной гибелью дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции и широким распространением внутриклеточного белка α -синуклеина [1]. За последние два десятилетия было отмечено увеличение заболеваемости и распространенности болезни Паркинсона [2]. Несмотря на успехи, достигнутые в лечении болезни Паркинсона, в настоящее время ни один препарат не может обратить вспять прогрессирующую потерю дофаминергических нейронов в мозге пациентов [3], поэтому разработка патогенетических противопаркинсонических препаратов остается актуальной задачей.

Моноотерпеноиды представляют собой перспективную основу для синтеза соединений с противопаркинсонической активностью. Так, ранее были обнаружены моноотерпеноид-диол и его активный метаболит эпоксидиол [4], показавшие противопаркинсоническую активность в различных экспериментальных моделях. Эти результаты подчеркивают значимость моноотерпеноидов как перспективной основы для разработки новых противопаркинсонических препаратов, направленных на ключевые патогенетические механизмы болезни Паркинсона, и целесообразность продолжения поиска соединений, обладающих выраженной противопаркинсонической активностью, синтезированных на основе диола. Таким образом, целью нашего исследования является выявление и изучение производных диола, обладающих противопаркинсонической активностью.

Экспериментальная часть

Для моделирования болезни Паркинсона использовали модель паркинсонического синдрома, индуцированного нейротоксином МФТП [5]. Самцам мышей C57Bl/6 (в каждой группе по 8 особей) вводился МФТП внутрибрюшинно четырехкратно с промежутком 2 часа. Через сутки после последней инъекции МФТП исследуемые агенты в дозе 20 мг/кг мышам вводили внутривентрикулярно, через 2 часа после введения проводили тесты «открытое поле»

(с помощью автоматизированной установки Tru Scan) и «на вешалке» для оценки влияния соединений на двигательную активность. Также оценивали влияние агентов на двигательную активность у самцов мышей CD-1 без индуцированного паркинсонизма в «открытом поле». Влияние на дофаминергическую систему оценивали с помощью модели каталепсии, вызванной введением галоперидола, у самцов мышей CD-1. Помимо этого, проводили оценку влияния перспективных агентов на холинергическую систему у самцов мышей CD-1 в тестах «ацетилхолиновые корчи» и «никотиновая токсичность».

Результаты обрабатывали статистически в программе Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Данные представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Достоверность различий между группами устанавливали по критерию Манна-Уитни при $p < 0,05$. Все работы с животными были проведены в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными и Приказом МЗ РФ № 199н от 1 апреля 2016 г. «Правила надлежащей лабораторной практики», а также в соответствии с протоколом исследования, утверждённым биоэтическим комитетом НИОХ СО РАН.

Результаты

По результатам проведенных скрининговых исследований были выявлены производные диола РА-198-1 и РА-198-2, влияние которых на двигательную активность мышей с индуцированным паркинсонизмом показано в табл. 1; значимого влияния соединений на двигательную активность мышей без паркинсонизма не было показано ($p > 0,05$). Результаты исследования на модели каталепсии, вызванной галоперидолом, представлены на рис. 1.

Таблица 1

Влияние исследуемых агентов на двигательную активность мышей с индуцированным паркинсоническим синдромом при четырехкратном введении МФТП

	Тест «открытое поле»			Тест «на вешалке»
	Двигательная активность (сек)	Дистанция движения (см)	Скорость движения (см/сек)	Время в движении (сек)
Контроль	78,6 ± 5,3	424,3 ± 39,6	3,5 ± 0,4	120 ± 0,0
МФТП 20 мг/кг *4 раза	36,2 ± 7,4 ***	149,4 ± 36,4 ***	1,2 ± 0,28 ***	73,3 ± 7,7 ***
МФТП + РА-198-1 (20мг/кг)	50,2 ± 8,6	222,6 ± 48,5 **#	1,8 ± 0,4 **#	31,4 ***
МФТП + РА-198-2 (20мг/кг)	57,6 ± 8,5	296,7 ± 51,8 #	2,4 ± 0,4 #	67,5 ± 14,2 ***

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ достоверность по сравнению с контрольной группой;

– $p < 0,05$ достоверность по сравнению с группой МФТП.

По результатам исследования влияния агентов РА-198-1 и РА-198-2 на холинергические рецепторы было выявлено значимое ($p = 0,01$) снижение летальности в тесте «никотиновая токсичность» при введении агента РА-198-2. В тесте «ацетилхолиновые корчи» значимых отличий для данных соединений продемонстрировано не было.

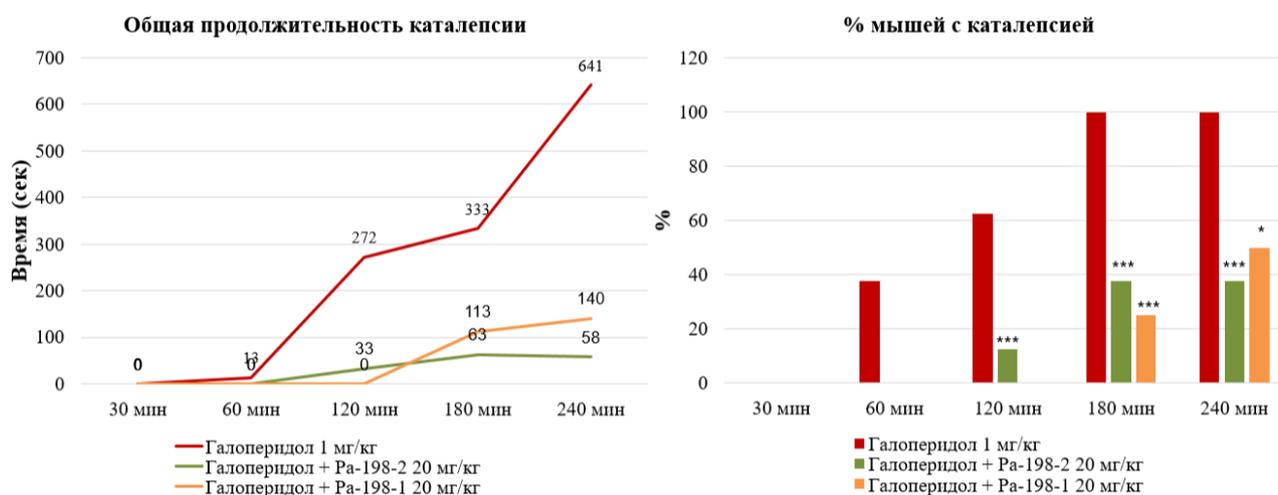


Рис. 1. Влияние агентов PA-198-1 и PA-198-2 на общую продолжительность катаlepsии и процент животных с развившейся катаlepsией при введении галоперидола;

* – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ достоверность по сравнению с группой галоперидола

Заключение

В результате проведенных исследований были выделены перспективные для дальнейшего изучения агенты PA-198-1 и PA-198-2, которые являются изомерами, что представляет дополнительный интерес для изучения взаимоотношений структуры и активности данных соединений. Данные агенты показали выраженную активность как в модели МФТП-индуцированного паркинсонизма, так и в модели катаlepsии, индуцированной галоперидолом. Результаты исследования влияния агентов у мышей без индуцированного паркинсонизма показывают отсутствие стимулирующего действия агентов, тем самым подтверждая наличие у них противопаркинсонической активности. При изучении влияния агентов на холинергические рецепторы центральной нервной системы было показано, что PA-198-2 взаимодействует с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами. Для PA-198-1 не было выявлено влияния на ацетилхолиновые рецепторы.

Полученные данные подтверждают перспективность дальнейшего изучения соединений, синтезированных на основе диола, для отбора соединений-кандидатов для дальнейшей разработки в качестве препаратов для лечения болезни Паркинсона.

Список литературы

1. Morris H.R., Spillantini M.G., Sue C.S., Williams-Gray C.H. The pathogenesis of Parkinson's disease // *Lancet*. – 2024. – Vol. 4. – P. 293–304.
2. Bloem B.R., Okun M.S., Klein C. Parkinson's disease // *Lancet*. – 2021. – Vol. 397. – P. 2284–2303.
3. Nemade D., Subramanian T., Shivkumar V. An Update on Medical and Surgical Treatments of Parkinson's Disease // *Ageing and Disease*. – 2021. – Vol. 12, № 4. – P. 1021–1035.
4. Kotliarova A., Podturkina A.V., Pavlova A.V. et al. A Newly Identified Monoterpenoid-Based Small Molecule Able to Support the Survival of Primary Cultured Dopamine Neurons and Alleviate MPTP-Induced Toxicity In Vivo // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, № 23. – P. 8286.
5. Jackson-Lewis V., Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease // *Nature Protocols* – 2007. – Vol. 2. – P. 141–151.

УДК: 616-006.6-577.218

Прогностическая значимость копийности генов WNT-сигналинга при раке гортаниИ.А. Цыденова^{1,2}, Д.С. Долгашева^{1,2}, К.А. Гаптулбарова^{1,2}

Научный руководитель: профессор, д.б.н., Н.В. Литвяков

Томский национальный исследовательский медицинский центр, НИИ онкологии,

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

Национальный исследовательский Томский государственный университет

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

E-mail: tsydenova422@gmail.com

Prognostic significance of WNT signaling gene copy number in laryngeal cancerI.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, RI Cancer, Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634009²Tomsk State University, Russia, Tomsk, 36 Lenin str., 634050

E-mail: tsydenova422@gmail.com

Abstract. *The association between hematogenous metastasis and CNA (Copy Number Aberration) loci of WNT-signaling pathway genes in laryngeal tumor was studied. WNT-signaling pathway genes that are associated with metastasis were identified. Forty-one patients with laryngeal cancer were included in the study. Ten of the 41 patients developed hematogenous metastases. Thirty genes of the WNT-signaling pathway were identified, whose CNAs in the residual tumor are associated with metastasis and can be used as a prognostic factor.*

Key words: *laryngeal cancer, metastasis, CNA.*

Введение

Рак головы и шеи является седьмым по распространенности типом рака в мире и включает в себя разнообразную группу опухолей, поражающих верхний дыхательный и пищеварительный тракт. Наиболее распространенным новообразованием в этой группе является рак гортани [1]. Ранее было показано, что при раке молочной железы (РМЖ) у 50 % больных после проведения неоадьювантной химиотерапии (НАХТ), у которых опухолевые клетки имеют амплификации генов стволовости и обладают способностью к дедифференцировке, не образуются метастазы. Было проанализировано состояние WNT-сигналинга у этих пациентов и было обнаружено, что метастазы образуются только у тех пациентов, у которых WNT-сигналинг находится в потенциально активированном состоянии за счет амплификаций генов активаторов и/или делеций генов негативных регуляторов генов WNT-сигналинга. Если у больных в опухоли, наоборот, отмечаются делеции активаторов и амплификации негативных регуляторов, то такие пациенты не метастазируют, несмотря на наличие амплификаций генов стволовости. В отсутствии амплификаций генов стволовости метастазирование не наблюдается вне зависимости от состояния генов WNT-сигналинга [2].

Цель работы: оценить CNA генов WNT-сигнального пути при раке гортани и связь CNA этих генов с метастазированием при раке гортани.

Экспериментальная часть

В исследование включено 41 пациент с плоскоклеточным раком гортани (T1-4N0-2M0), которые проходили лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ. Возраст пациентов варьировал от 46 до 86 (средний возраст 62 года). Все процедуры проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией (1964 г., с изменениями 1975 и 1983 гг.).

ДНК выделяли из свежих образцов опухолевых тканей после НХТ с помощью набора QIAamp DNA mini. Для изучения CNAs опухоли рака гортани проводили микрочиповой анализ

с использованием высокоплотной микрочиповой платформы Affymetrix (США) CytoScan™ HD Array, (<http://www.affymetrix.com/esearch/search.jsp?pd=prod520004&N=4294967292>). Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя с использованием системы Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, США). Использовалось программное обеспечение Chromosome Analysis Suite 4.0 (Affymetrix, США), специально разработанное для анализа результатов микрочипов CytoScan™ HD Array. Несбалансированные хромосомные aberrации (делеции и амплификации, или потери и усиления) были обнаружены во всех хромосомных регионах.

Используя базу данных KEGG GSEA (http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/KEGG_WNT_SIGNALING_PATHWAY) и reactome (<https://reactome.org/PathwayBrowser/#/R-HSA-195721>), было отобрано 302 гена WNT-сигнального пути человека. Были найдены гены, которые локализованы в цитобандах с наибольшей частотой амплификаций и делеций. На следующем этапе каждый из отобранных генов был аннотирован с использованием нескольких баз данных: Reactome (<https://reactome.org>), UniProt (<https://www.uniprot.org>), GeneCards (<https://www.genecards.org/>), OMIM (<https://omim.org/>), Wnt signaling pathway Gene Ontology Term (http://www.informatics.jax.org/vocab/gene_ontology/GO:0016055), KEGG PATHWAY: Сигнальный путь Wnt pathway – Homo sapiens (human) (https://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa_04310.html) и определена роль гена в регуляции WNT-сигнального пути.

Результаты

Всего в хромосомных регионах с наибольшей разницей в частотах делеций и амплификации было локализовано 30 сигнальных генов WNT: GNG5, WLS, GSK3B, RUVBL1. Все идентифицированные гены WNT-сигнализации были разделены на три большие группы. В первую группу вошли активаторы WNT-сигналинга; в нее вошли гены рецепторов сигнального пути WNT, рецепторные лиганды, вторичные мессенджеры и факторы транскрипции, играющие ключевую роль в работе WNT-пути. Также в эту группу вошли два циклина D3 и D1, которые запускают клеточный цикл через WNT-сигнализацию и являются конечной точкой WNT-сигнального пути. Активация WNT-сигнализации должна существенно облегчаться при амплификации хромосомных районов локализации этих генов и существенно затрудняться при делециях. Вторая группа генов включала гены, продукты которых, согласно OMIM и GeneCards, негативно регулируют сигнальный путь WNT (зеленый цвет). Активация WNT-сигнализации должна значительно облегчаться при делециях хромосомных районов локализации этих генов и значительно затрудняться при их амплификации. Третью группу составили позитивные регуляторы канонических и неканонических сигнальных путей WNT. В нее вошли некоторые транскрипционные факторы, вторичные мессенджеры, киназы. Они могут оказывать заметное, но не столь критическое влияние как активаторы на WNT-сигнальный путь, при этом активность продуктов этих генов может либо подавляться другими факторами, либо принадлежать к неканоническому пути, либо регулировать проявления WNT-сигнализации, мало связанные с пролиферацией, миграцией, адгезией и стволообразованием, то есть те механизмы, которые необходимы для метастазирования. СNA-регионы локализации этих генов были исключены из дальнейшего анализа из-за высокой плейотропности взаимных влияний и низкой значимости для механизмов метастазирования. После такого предварительного биоинформационного отбора генов WNT-сигнализации связь с метастазированием оценивалась только для первой и второй групп генов. Согласно рабочей гипотезе, метастазированию должно способствовать усиление локусов генов первой группы и удаление локусов генов второй группы, а ингибирование метастазирования должно осуществляться путем удаления локусов генов первой группы и усиления локусов генов второй группы. Различия между группами статистически значимы по данным двустороннего теста Фишера с высоким уровнем доверительной вероятности и log-rank теста при оценке

безметастатической выживаемости по методу Каплана-Майера (рис. 1). Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что CNA-гены WNT-сигнализации ассоциированы с метастазированием, а прогностическое значение CNA-генов WNT-сигнализации в остаточных опухолях является высокопрогностичным, что подтверждает нашу рабочую гипотезу о том, что CNA-гены WNT-сигнализации вовлечены в реализацию процесса метастазирования.

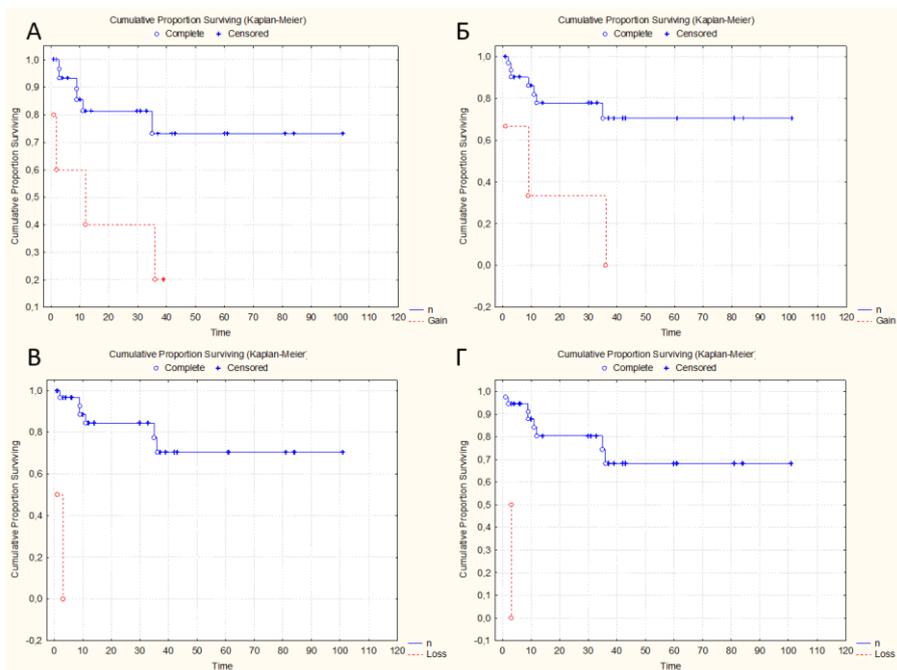


Рис. 1. Безметастатическая выживаемость с учетом амплификаций и делеций для генов: А) *LGR5*; Б) *PSMB3*; В) *GNGT1*; Г) *TNRC6A*

Заключение

Результаты исследования подтверждают рабочую гипотезу о том, что CNAs сигнальных генов WNT вовлечены в метастатический процесс. Также было идентифицировано 30 генов WNT-сигнального пути и обнаружено, что aberrации числа копий этих генов ассоциированы с метастазированием.

Список литературы

1. Igissin N., Zatonkikh V., Telmanova Z., Tulebaev R., Moore M. Laryngeal Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention: A Narrative Review // *Iran J Public Health*. – 2023. – Vol. 52 (11). – P. 2248–2259.
2. Litviakov N.V., Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., Deriusheva I.V., Pevsner A.M., Garbukov E.Yu., Doroshenko A.V., Slonimskaya E.M. Association of the combination of stemness gene amplifications and copy number aberrations of WNT-signaling genes in breast tumors with metastasis // *Siberian journal of oncology*. – 2020. – Vol. 19 (3). – P. 78–88.

УДК 616-092.9

**Оценка изменений параметров воспалительной реакции в периваскулярной жировой
ткани во взаимосвязи с уровнем лептина в экспериментальной модели
диет-индуцированного метаболического синдрома**

Н.А. Чернышов, О.В. Воронкова, Ю.Г. Бирулина

Научный руководитель: доцент, д.м.н. О.В. Воронкова

Сибирский государственный медицинский университет Минздрава РФ,

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

E-mail: nchernyschov@mail.ru

**Assessment of changes in the parameters of the inflammatory response in perivascular
adipose tissue in relation to the level of leptin in an experimental model of diet-induced
metabolic syndrome**

N.A. Chernyshev, O.V. Voronkova, J.G. Birulina

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

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

E-mail: nchernyschov@mail.ru

Abstract. *This study presents the results of assessing changes in inflammatory response biomarkers in perivascular adipose tissue (PVAT) in relation to serum leptin levels in rats with diet-induced metabolic syndrome (MS). The results of the study revealed an increase in the secretion of proinflammatory cytokines by PVAT cellular elements, correlating with an increase in serum leptin levels.*

Key words: *perivascular adipose tissue, metabolic syndrome, inflammation.*

Введение

В настоящее время заболевания сердечно-сосудистой системы занимают лидирующую позицию как основная причина смертности и ранней инвалидизации трудоспособного населения [1]. По мере развития представлений о механизмах, лежащих в основе развития сердечно-сосудистых заболеваний, все больше внимания уделяется периваскулярной жировой ткани (ПВЖТ), которая окружает большинство кровеносных сосудов млекопитающих, является метаболически активным органом и обладает способностью регулировать тонус кровеносных сосудов, рост и пролиферацию гладкомышечных клеток сосудистой стенки, а также функцию эндотелия [2]. Метаболический синдром (МС) и ассоциированное с ним абдоминальное ожирение сопровождается развитием воспаления в висцеральной жировой ткани. Гипертрофированные адипоциты и резидентные макрофаги продуцируют большое количество провоспалительных цитокинов, хемокинов и адипоцитарных гормонов (лептин, адипонектин, резитин и др.) приводя к формированию в организме системного воспалительного ответа [3]. На фоне МС и системного воспаления происходит нарушение секреторной активности клеточных элементов ПВЖТ, а в спектре вырабатываемых ими веществ начинают преобладать провоспалительные медиаторы и вазоконстрикторы. Развитие воспаления в ПВЖТ и преобладание вазоконстрикторных эффектов на сосудистую стенку со стороны клеточных элементов ПВЖТ могут способствовать развитию и прогрессированию сердечно-сосудистых заболеваний, которые так часто встречаются при ожирении и МС [4]. В связи с этим была определена цель исследования: оценить изменения биомаркеров воспалительной реакции в ПВЖТ и охарактеризовать их взаимосвязь с уровнем лептина в сыворотке крови у крыс на фоне диет-индуцированного МС.

Экспериментальная часть

Исследование было выполнено на 24 крысах-самцах линии Wistar. Протокол исследования был одобрен комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных

(IACUC) (протокол № 1 от 06.03.2024 г.). МС у экспериментальных животных формировали путем содержания животных опытной группы ($n = 12$) на высокожировой и высокоуглеводной диете (ВЖВУД) в течение 12 недель (белки : жиры : углеводы 16 % : 21 % : 54 %). Животные контрольной группы ($n = 12$) получали стандартный корм (белки : жиры : углеводы 24 % : 6 % : 44 %). После выведения животных из эксперимента (методом CO_2 -асфиксии) из сердца отбирали кровь для получения сыворотки, извлекали грудной отдел аорты (для получения фрагментов ПВЖТ). Фрагменты ПВЖТ немедленно отделяли от аорты и помещали в раствор холодного фосфатно-солевого буфера (PBS). Затем навески жировой ткани (по 150 мг) переносили в лунки культурального планшета, содержащие питательную среду. Через 24 ч из лунок отбирали аликвоты среды, в которой определяли концентрацию цитокинов (IL-6, IL-10, TNF α , MCP-1) методом ИФА с использованием соответствующих наборов реагентов (Rat ELISA Kit, ELK Biotechnology, КНР). В сыворотке крови определяли содержание глюкозы, триацилглицеролов, холестерина (колориметрические наборы, Chronolab, Испания), инсулина (Rat INS (Insulin) ELISA Kit, Elabscience, КНР), лептина (Rat Leptin ELISA Kit, ELK Biotechnology, КНР). Рассчитывали индекс НОМА-IR. Статистическую обработку данных проводили в программе SPSS Statistics 23. Данные представляли в виде ($M \pm SD$) и ($Me (Q_{25}; Q_{75})$). Анализ различий между данными проводили при помощи t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки взаимосвязи между параметрами определяли коэффициент ранговой корреляции (r) Спирмена.

Результаты

Содержание крыс на ВЖВУД в течение 12 недель сопровождалось развитием гипергликемии, инсулинорезистентности, а также повышением концентрации триацилглицеролов, холестерина и лептина в сыворотке крови. У животных опытной группы наблюдалось увеличение массы тела и ожирение, оцениваемое по удельной массе абдоминального жира (табл. 1).

Таблица 1

Морфометрические и биохимические показатели крыс $M \pm SD$

Параметр	Контрольная группа ($n = 12$)	Опытная группа ($n = 12$)
Глюкоза, ммоль/л	$5,3 \pm 0,5$	$7,6 \pm 0,2^*$
Инсулин, пмоль/л	$11,9 \pm 0,7$	$22,3 \pm 5,9^*$
НОМА-IR	$2,2 \pm 0,2$	$6,9 \pm 1,3^*$
ТАГ, ммоль/л	$0,8 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,4^*$
ХС, ммоль/л	$1,8 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,4^*$
Лептин, нг/мл	$2,9 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,4^*$
Масса тела, г	$430,3 \pm 25,4$	$485,1 \pm 33,8^*$
Удельная масса абдоминального жира, г	$2,1 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,5^*$

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$.

Одним из основных звеньев патогенеза МС, ассоциированного с ожирением, является хроническое системное воспаление, в формирование которого значительный вклад может вносить усиление провоспалительной и хемотаксической активности ПВЖТ [5]. По результатам исследования цитокин-продуцирующей функции ПВЖТ мы зарегистрировали усиление секреции провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF α , MCP-1) и снижение наработки противовоспалительного IL-10 (табл. 2).

Таблица 2

Концентрация цитокинов в кондиционной среде ПВЖТ крыс, Ме(Q₂₅;Q₇₅)

Концентрация цитокинов, пг/мл	Контрольная группа (n = 12)	Опытная группа (n = 12)
IL-6	63,5 (57,8;76,7)	107,5 (103,5;170,9)*
IL-10	26,5 (24,8;29,7)	20,5 (12,3;29,1)*
TNF α	18,1 (15,5;21,6)	28,9 (20,5;38,6)*
MCP-1	135,9 (110,6;176,6)	272,7 (161,6;309,1)*

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$.

По результатам корреляционного анализа были выявлены прямые положительные связи между концентрацией IL-6 ($r = 0,57$, $p < 0,05$), TNF α ($r = 0,61$, $p < 0,05$) и MCP-1 ($r = 0,55$, $p < 0,05$) и уровнем лептина в сыворотке крови. Между концентрацией IL-10 и уровнем лептина была выявлена отрицательная корреляционная связь ($r = -0,32$, $p < 0,05$).

Лептин является пептидным гормоном, регулирующим в норме пищевое поведение. Взаимодействие лептина с рецепторами гипоталамуса подавляет чувство голода. Помимо этого, лептин является адипоцитарным гормоном с провоспалительными свойствами. При ожирении наблюдается повышение уровня лептина в крови, что связано с повышенной выработкой данного гормона адипоцитами висцеральной жировой ткани, а также с развитием лептинорезистентности. Было показано, что при МС, ассоциированном с ожирением, уровень гиперлептинемии коррелирует с частотой развития сердечно-сосудистых осложнений [5]. Согласно данным литературы, высокая концентрация лептина при ожирении способствует усилению экспрессии клеточных адгезивных молекул, стимулирует рекрутирование Т-лимфоцитов и моноцитов из периферической крови в ПВЖТ. В дальнейшем происходит трансформация рекрутированных моноцитов в макрофаги М1-фенотипа, что способствует прогрессированию воспалительной реакции [2].

Заключение

В результате проведенных исследований было показано, что содержание крыс на ВЖВУД в течение 12 недель приводит к развитию абдоминального ожирения и других компонентов МС (гипергликемия, инсулинорезистентность, нарушения липидного спектра). Усиление секреции провоспалительных цитокинов клеточными элементами ПВЖТ и наличие положительных корреляционных связей с повышенным уровнем лептина в сыворотке крови у крыс свидетельствует об изменении функционального состояния ПВЖТ на фоне МС и ожирения, что может вносить значительный вклад в формирование эндотелиальной дисфункции и развитие сердечно-сосудистых осложнений при МС.

Список литературы

1. Vaduganathan M., Mensah G.A., Turco J.V., Fuster V., Roth G.A. The global burden of cardiovascular diseases and risk: A compass for future health // Journal of the American College of Cardiology. – 2022. – Vol. 80, N 25. – P. 2361–2371.
2. Adachi Y., Ueda K., Takimoto E. Perivascular adipose tissue in vascular pathologies—a novel therapeutic target for atherosclerotic disease? // Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2023. – N 10. – P. 1151717.
3. Романцова Т.И., Сыч Ю.П. Иммунометаболизм и метавоспаление при ожирении // Ожирение и метаболизм – 2019. – Т. 16, № 4. – С. 3-17.
4. Stanek A., Brożyna-Tkaczyk K., Myśliński W. The Role of Obesity-Induced Perivascular Adipose Tissue (PVAT) Dysfunction in Vascular Homeostasis // Nutrients. – 2021. – Vol. 13, N 11. – P. 3843.
5. Чаулин, А.М. Роль лептина в патогенезе атеросклероза: акцент на взаимодействии лептина с макрофагами // Научное обозрение. Биологические науки. – 2021. – № 3. – С. 5–10.

УДК 576.577

Эффекты комбинированного цитотоксического воздействия на клеточные культуры наночастиц и бинарных наночастиц оксидов марганца и кобальтаВэньцзин Чжэн^{1,2}Научный руководитель: д.б.н. И.А. Разумов²¹Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2, 630090²Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, 630090E-mail: v.chzhen@g.nsu.ru**Effects of combined cytotoxic action on cell cultures of nanoparticles and binary nanoparticles of manganese and cobalt oxides**Wenjing Zheng^{1,2}Scientific Supervisor: Dr. I.A. Razumov²¹Novosibirsk National Research State University, Russia, Novosibirsk, Pirogov str., 2, 630090²Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Russia, Novosibirsk, Akademika Lavrentyeva str., 10, 630090E-mail: v.chzhen@g.nsu.ru

Abstract. *The aim of this study was to evaluate the cytotoxic effect of single metal oxide nanoparticles (Mn and Co) and bimetallic nanoparticles (BNP Mn/Co) on various tumor cells (U87, SK-Mel-28, HepG2, HEK293T) at different concentrations and time intervals. The effect of combined and sequential addition of nanoparticles on cell viability was analyzed using MTT analysis. The results of assessing the cytotoxicity of nanomaterials in vitro on tumor cell lines revealed efficacy in the following order: NP Mn+Co(1h) > NP Mn+Co (24h) > NP Mn ≥ NP Co > NP Mn+Co (mixture) > BNP Mn/Co.*

Key words: *Nanoparticles, Cytotoxicity, Bimetallic Nanoparticles, Antitumor Activity, MTT Assay.*

Введение

Особое внимание уделяется современным исследованиям в области разработок нового поколения наноагентов, обладающих усиленным и пролонгированным действием на патогены и опухолевые клетки, и низкой токсичностью против нормальных клеток. Результаты исследований многокомпонентных систем демонстрируют наличие у нанокомпозитов на основе оксидов металлов более выраженной активности и синергетического эффекта по сравнению с активностью индивидуальных оксидов [1–3]. Многокомпонентные системы наночастиц демонстрируют широкий спектр превосходных химических, медикобиологических, механических и термических свойств благодаря синергетическим эффектам. Однако, критические вопросы, касающиеся стабильности, биосовместимости и их цитотоксических эффектов, еще предстоит решить.

Цель работы – экспериментально оценить комбинированное цитотоксическое воздействие на клеточные культуры противоопухолевых одноэлементных НЧ оксидов Mn [4, 5] и Co и биметаллических наночастиц (BNP) Mn/Co в различных концентрациях и при различных временных интервалах введения в ростовую среду клеток.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования выступали наночастицы оксидов Mn и Co, а также бинарный нанокомпозит Mn/Co. С помощью МТТ-теста и анализа полученных результатов (определение СС50) проведена оценка комбинированного действия НЧ и BNP Mn/Co в различных концентрациях на жизнеспособность опухолевых U87, SK-Mel-28, HepG2, 786-O,

НЕК293Т. Определение концентрации металлов в нанопрепаратах, используемых в МТТ были проведены методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на ICAP 6500 DUO4 в ИНХ СО РАН.

Результаты

Комбинация нескольких различных металлических наночастиц была использована в этом исследовании для сравнения эффектов нескольких металлических наночастиц при комбинированном использовании и при использовании по отдельности в качестве одноэлементных наночастиц против опухолевых клеток человека. Клеточные линии подвергались воздействию либо смеси наночастиц оксидов Mn и Co (смешивали в течении 5 мин), либо бинарного нанокompозита Mn/Co, а также последовательному введению в культуры клеток с начала НЧ MnO, а затем с интервалом 1 и 24 часа НЧ оксида кобальта. Эксперименты были повторены три раза для достоверности и результаты типичного графика представлены на рис 1.

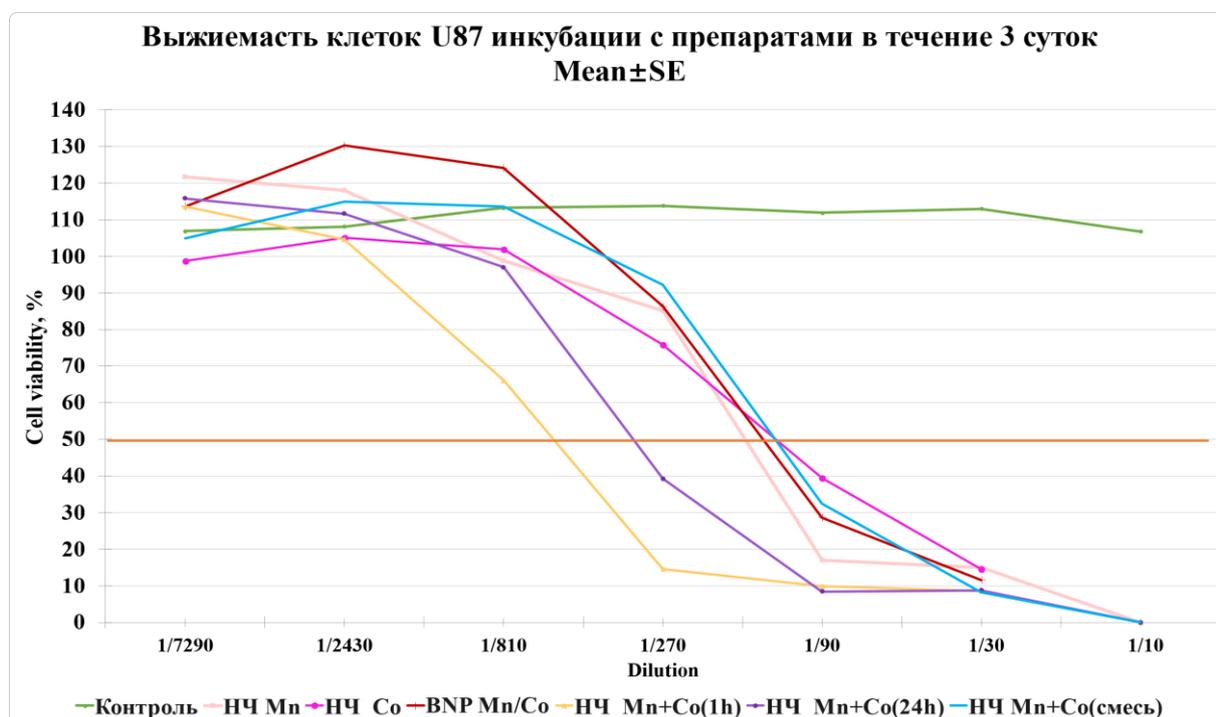


Рис. 1. Определение токсичности наночастиц металлов в МТТ-тесте на культуре клеток U87. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, $n = 3$

Анализ результатов МТТ-тестов *in vitro*, определение CC_{50} , концентрации вызывающей гибель 50 % клеток, как представлено в таблице 1, позволили выявить: – статистически значимую зависимость повреждения клеток различных линий от концентрации наночастиц оксидов металлов, как при совместном, так и при раздельном их применении.

Все синтезированные наночастицы проявили цитотоксическую активность против используемых культур опухолевых клеток. При этом BNP Mn/Co не был более токсичным, чем НЧ отдельных оксидов металлов Mn и Co в используемых концентрациях. НЧ MnO и оксида кобальта проявили подобную или сравнимую высокую цитотоксическую активность против опухолевых клеток. При одновременном воздействии смеси наночастиц оксида марганца и кобальта не наблюдалось повышения токсичности по сравнению с воздействием только одного типа наночастиц. Сравнительные и комбинированные повреждающие эффекты наночастиц при совместном введении и по отдельности, при последовательном добавлении, с

интервалом 1 и 24 часа достоверно различались, и максимальная цитотоксичность была выявлена при добавлении наночастиц с интервалом 1 час.

Таблица 1

Цитотоксичность (CC50 мкг/мл) НЧ в отношении клеток U-87, SK-Mel-28, HepG2, HEK293T по результатам МТТ-теста ($M \pm SE$)

NP	U87	SK-Mel-28	Hep-G2	HEK293T
	Glioblastoma	Melanoma	Liver carcinomaпечени	Kidney
Mn	11,5 ± 0,8	22,8 ± 2,7	7,1 ± 0,9	16,0 ± 1,9
Co	15,7 ± 1,2	13,2 ± 0,6	5,7 ± 0,9	10,4 ± 0,5
MnCo	25,2 ± 2,5	98,5 ± 12,3	30,2 ± 4,8	46,3 ± 4,7
Mn+Co (через 1ч)	5,9 ± 0,9	11,8 ± 2,9	4,2 ± 0,7	6,3 ± 1,3
Mn+Co (через 24ч)	11,0 ± 0,9	21,5 ± 8,1	9,0 ± 1,7	-
Mn+Co (смесь)	17,9 ± 1,9	39,5 ± 0,7	19,3 ± 2,1	44,1 ± 5,3

Примечание: “-” - Эксперимент продолжается, данных пока не получено. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Испытания цитотоксичности наноматериалов *in vitro* на линиях опухолевых клеток показали эффективность в следующем порядке: НЧ Mn+Co(1h) > НЧ Mn+Co (24h) > НЧ Co > НЧ Mn ≥ НЧ Mn+Co (смесь) > BNP Mn/Co.

Заключение

Итак, результаты экспериментов, по нашему мнению, демонстрируют, что исследуемые металлические наночастицы могут быть использованы в комбинации для повышения противоопухолевой эффективности в уничтожении опухолевых клеток различного тканевого происхождения.

Список литературы

1. Duraisamy, M., Sreekantan, S., Govindasamy, G.A. et al. An in-vitro study of antibacterial, cytocompatibility and physicochemical properties of TiO₂-ZnO nanocomposite. // J Sol-Gel Sci Technol. – 2024. – Vol. 25 (18). – P. 4383–4391.
2. Haseena Makada, Saffiya Habib, Moganavelli Singh, Bimetallic nanoparticles as suitable nanocarriers in cancer therapy. // Scientific African. – 2023. – Vol. 20. – P. e01700.
3. Винарделл М., Митянс М., Противоопухолевая активность наночастиц оксидов металлов. // Наноматериалы. – 2015. – № 5. – С. 1004–1021.
4. Разумов И.А., Троицкий С.Ю., Соловьева О.И., Болдырев Н.Д., Завьялов Е.Л. // Наночастицы оксида марганца избирательно ингибируют рост подкожных ксенографтов U-87 MG у иммунодефицитных мышей. Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2020. – № 3. – С. 191–196.
5. Razumov I.A., Troitskii S.Y., Solovieva O.I., Boldyrev N.D. and Zavjalov E.L. Manganese oxide nanoparticles inhibit selectively the *in vitro* and *in vivo* growth of human colorectal SW620 adenocarcinoma cells. // Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology. – 2022. – Vol. 13, № 2. – P. 25009.

УДК: 616-006.04-008.9:575.113.2

**Оценка изменений частоты CNA генов эксцизионной репарации
в опухоли молочной железы**

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

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

Томский национальный исследовательский медицинский центр НИИ онкологии

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

E-mail: arisha.shagabudinova@mail.ru

Assessment of changes in the CNA frequency of excision repair genes in breast tumors

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

Scientific Supervisor: PhD. M.K. Ibragimova

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

E-mail: arisha.shagabudinova@mail.ru

Abstract. *The treatment of breast cancer (BC) often includes systemic neoadjuvant chemotherapy (NAC), where anthracycline- and taxane-containing drugs are the most effective. The primary goal of NAC is to achieve a complete pathological response (pCR); however, its frequency varies depending on the molecular subtype of BC and ranges from only 1–45 %. For HER2-negative (HER2-) BC, the likelihood of pCR remains low, and the presence of residual disease complicates the prognosis. At the same time, the survival rate of patients with complete or partial tumor regression is significantly higher than that of patients with disease progression. Therefore, for HER2-negative BC, identifying predictive markers, such as CNA (copy number aberrations), is crucial, as they can help optimize neoadjuvant treatment and improve clinical outcomes.*

Key words: *breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, pCR, CNA, excision repair genes.*

Введение

Лечение рака молочной железы (РМЖ) является комбинированным и во многих случаях включает системную неоадьювантную химиотерапию (НХТ) [1]. В настоящее время одними из наиболее эффективных и активно применяемых цитостатических средств для лечения РМЖ в НХТ, являются антрациклин-содержащие и таксан-содержащие препараты. Одной из ключевых целей применения НХТ является достижение полного патоморфологического ответа (pCR) опухоли, однако в клинической практике такой результат зависит от молекулярного подтипа РМЖ и наблюдается лишь в 1–45 % случаев. При этом наблюдается значительная разница в выживаемости пациентов, у которых в ходе НХТ достигнута полная или частичная регрессия опухоли, по сравнению с пациентами, у которых отмечается стабилизация или прогрессирование опухолевого процесса. Для HER2-негативного (HER2-) РМЖ вероятность pCR остается относительно низкой, а наличие остаточного заболевания затрудняет точный прогноз, в отличие от других подтипов РМЖ [2].

Многие химиотерапевтические препараты (в том числе антрациклины и таксаны) вызывают повреждения ДНК в опухолевых клетках. В свою очередь гены системы эксцизионной репарации отвечают за устранение этих повреждений. Если репарационные механизмы работают эффективно, опухолевые клетки могут выживать, что снижает эффективность химиотерапии. Напротив, снижение активности этих генов может повышать чувствительность опухоли к лечению. В связи с этим, для HER2- РМЖ особенно важно выявление прогностических маркеров полной и частичной регрессии, что позволит назначить оптимальное неоадьювантное лечение. В качестве таких маркеров могут рассматриваться CNA (copy number aberration – абберации числа копий ДНК), которые формируют генетический ландшафт опухолей. Таким образом, целью проведенного исследования является оценка изменений частоты CNA генов системы эксцизионной

репарации (ГЭР) в опухоли молочной железы в процессе лечения при применении стандартных схем НХТ.

Экспериментальная часть

В исследование включены 63 больных с морфологически верифицированным диагнозом РМЖ T₁₋₄N₀₋₃M₀ (IIA–IIIВ стадии) люминального В HER2-негативного подтипа, в возрасте 24–68 лет (средний возраст 47,1 ± 0,3 лет (Mean ± SE)). В качестве исследуемого материала были использованы биопсийные опухолевые образцы и операционный материал после НХТ. ДНК из опухолевой ткани выделяли из 63 парных образцов опухоли до лечения и после НХТ при помощи набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany # 51304) в соответствии с инструкцией производителя. Для анализа aberrаций числа копий (CNA) проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности CytoScan™ HD Array (Affymetrix (USA)). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 8.0».

Результаты

В результате оценки изменения CNA регионов локализации ГЭР в опухоли молочной железы было проведено описание CNA-ландшафта опухоли до и после лечения и оценены изменения в частоте CNA. Установлено, что в опухоли пациенток до лечения наибольшее количество амплификаций регионов локализации ГЭР (44,44 %) обнаружено в локусе 1q21.1 (расположен ген *CHD1L*), а наибольшая частота делеций регионов локализации ГЭР (61,9 %) обнаружена в локусе 8p12 (расположен ген *WRN*). Также показано, что в локусах 10q24.1 и 10q24.32 (расположены гены *MMS19* и *POLL*, соответственно) присутствует 36,51 % делеций при полном отсутствии амплифицированных участков.

В опухоли пациенток после лечения наибольшее количество амплификаций (23,81 %) регионов локализации ГЭР обнаружено в локусе 11q13.4 (расположен ген *POLD3*), а наибольшая частота делеций регионов локализации ГЭР (30,16 %) обнаружена в локусе 11q22.3 (расположен ген *ATM*). Также показано, что в опухоли после НХТ в локусе 19p13.3 (расположены гены *SIRT6* и *GADD45B*) присутствует 11,11 % делеций при полном отсутствии амплифицированных участков (рис. 1).

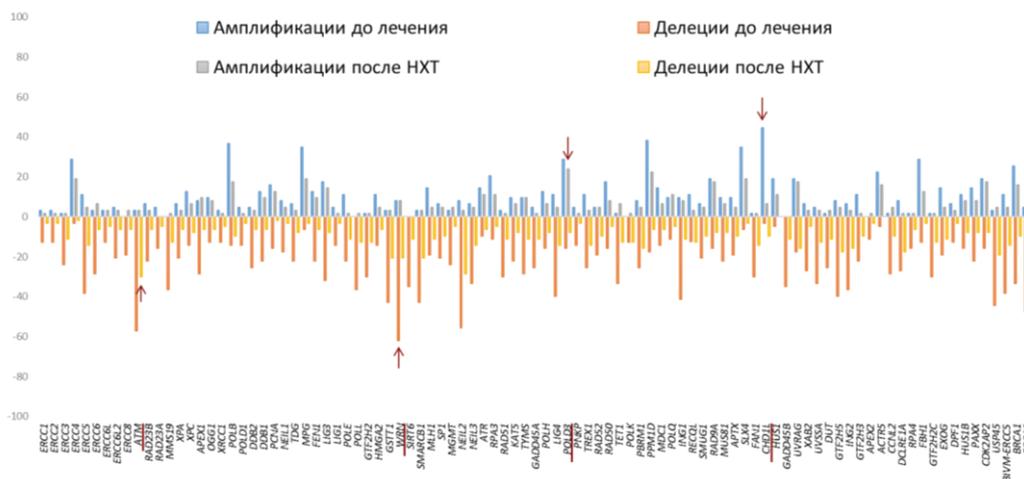


Рис. 1. Частота амплификаций и делеций в каждом из регионов локализации исследуемых ГЭР в опухоли больных РМЖ до и после лечения

Далее для оценки изменения CNA регионов локализации ГЭР в опухоли молочной железы в зависимости от применения различных стандартных схем НХТ, все пациенты были разделены на 2 группы. 1 группу составили пациенты, получившие в режиме НХТ антрациклин-

содержащие схемы (САХ (циклофосфан, доксорубин, капецитабин), АСТ (доксорубин, циклофосфан, таксотер), ФАС (фторурацил, доксорубин, циклофосфамид)). Во 2 группу включены пациенты, получившие в режиме НХТ таксан-содержащие схемы лечения (АТ (доксорубин, таксотер), таксотер в моно-режиме).

В результате сравнения частот CNA регионов локализации ГЭР в опухоли до и после лечения для пациентов 1 группы обнаружено статистически значимое снижение частоты делеций в 17 локусах (4p16.3, 5q13.3, 8p12, 8p23.1, 10q24.1, 10q24.32, 10q25.3, 10q26.3, 11q22.3, 13q13.1, 13q33.1, 13q33.3, 13q34, 17q12, 17q21.31, 19p13.3, 22q11.23) ($p < 0,05$), а также статистически значимое снижение частоты амплификаций в 1 локусе: 10p15.1 (расположен ген *FBH1*) с 29,55 % до 9,09 % ($p = 0,028$).

Сравнение изменений частот CNA регионов локализации ГЭР в процессе НХТ во 2 группе пациентов показало статистически значимое снижение частоты делеций в 5 локусах (6q16.2, 10q11.23, 13q33.3, 13q34, 14q11.2) ($p < 0,05$), при этом, статистически значимого изменения частоты амплификаций обнаружено не было (рис. 2).

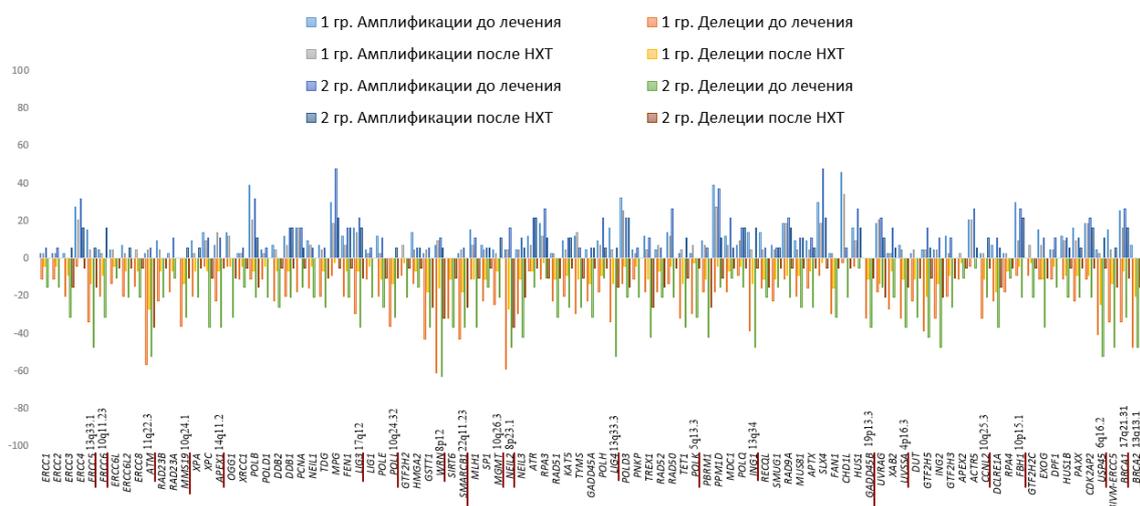


Рис. 2. Распределение частот CNA в регионах локализации генов эксцизионной репарации до и после лечения в исследуемых группах в зависимости от примененных схем неoadъювантной химиотерапии (1 группа – антрациклин-содержащие схемы НХТ; 2 группа – таксан-содержащие схемы)

Заключение

В результате проведения исследования определены наибольшие частоты CNA регионов локализации генов системы эксцизионной репарации в опухоли до и после лечения, а также оценены изменения CNA регионов локализации ГЭР в опухоли молочной железы в зависимости от применения различных стандартных схем НХТ.

Список литературы

1. Тюляндин С.А., Артамонова Е.В., Жигулев А.Н., и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы // Практические рекомендации RUSSCO, Часть 1. Злокачественные опухоли. – 2023. – Т. 13, № 3s2. – С. 157–200.
2. Spring L.M., et al. Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis // Clinical Cancer Research. – 2020. – № 12 (26). – P. 2838–2848.

УДК 616-092.9

The Effect of CNTN6 Deletion on Brain Myelination in MiceM.M. Shadrina^{1,2}, Ya.A. Tumentseva¹, D.A. Tur³Scientific Supervisor: Prof., Ph.D. M.Yu. Khodanovich¹¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36 634050²Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow tract, 2 634050³Institute of Cytology and Genetics, Russia, Novosibirsk, Academician Lavrentyev str., 10, 630090E-mail: shadrina@mail.tsu.ru

Abstract. Myelination is essential for efficient neural signaling and CNS function. Contactin-6 (CNTN6) is involved in neurite growth, neural networks maintenance, and oligodendrocyte maturation, but its role in myelination remains unclear. This study examined the effects of CNTN6 deletion on myelin content in various brain structures (cerebral cortex, corpus callosum, internal capsule, hippocampus, caudoputamen, cerebellar white matter) using quantitative histology. It was found that the CNTN6^{-/-} mice showed significantly reduced myelin content compared to C57Bl mice in both males and females. The significant differences between mice with the CNTN6^{-/-} and C57Bl genotypes were observed in the corpus callosum, cortex, internal capsule, and caudoputamen. Males affected more than females. In males, significant reductions were observed in all investigated brain structures while in females the cortex and hippocampus remained unaffected. In males, significant reductions were observed in all investigated brain structures while in females the cortex and hippocampus remained unaffected. Our findings confirm the important role of CNTN6 role in brain myelination.

Key words: Myelination, CNTN6, oligodendrocytes, white matter, sex differences.

Introduction

Contactin 6 (CNTN6) is a protein from the contactin family that plays crucial roles in neurodevelopment, including neural network formation, dendritic and axonal growth, and oligodendrocytogenesis. As a neural cell adhesion molecule, it mediates interactions between neurons and glial cells, guiding axonal pathfinding and synaptic organization. CNTN6 is highly expressed in brain regions responsible for cognition and motor functions, such as the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum.

Genetic studies have linked CNTN6 mutations and deletions to neurological and psychiatric disorders, including mental retardation, autism spectrum disorders (ASD), ADHD, Tourette syndrome, and schizophrenia. These findings suggest CNTN6 is essential for neural circuit development and maintenance. Disruptions in CNTN6 expression are associated with cortical connectivity deficits and sensorimotor impairments.

A key but poorly understood function of CNTN6 is its role in myelination, a process crucial for efficient neural signal transmission. Myelin sheaths, formed by oligodendrocytes, are vital for brain function, and myelination defects are linked to cognitive and motor impairments. Although CNTN6 interacts with myelin-associated glycoprotein (MAG), its precise role in oligodendrocyte function and myelin formation remains unclear.

To examine the effects of CNTN6 deletion on white and gray matter myelination, we used Luxol Fast Blue (LFB) histological staining. This method visualizes and quantifies myelin density in key brain regions, including the corpus callosum, internal capsule, caudate-putamen, motor cortex, hippocampus, and cerebellum. Comparing myelination patterns in CNTN6-deficient and wild-type mice, we aim to clarify how the absence of this protein affects neural pathways and contributes to neurodevelopmental disorders.

Research methods

The study involved transgenic mice with a deletion of the CNTN6 gene (CNTN6^{-/-}) obtained on the basis of the C57Bl/6 line of both sexes (n = 10 ♂ and 10 ♀), as well as control mice of the C57Bl/6 line (n = 6 ♂ and 5 ♀) aged 12 weeks, which were obtained from the Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia). All procedures were carried out in accordance with ethical guidelines, and the study was approved by the Bioethics Committee of TSU (dated 04.04.2022, registration number 10). Experimental animals were kept under standard conditions with controlled temperature and humidity, a 12-hour light/dark cycle and free access to food and water.

To analyze brain myelination, histological staining of frozen coronal brain sections was performed with Luxol Fast Blue (LFB) to visualize and quantify myelin density. Sections were collected at three stereotaxic coordinates: + 0.86 mm, -1.58 mm, and -6.12 mm from bregma, covering the main brain regions involved in motor and cognitive functions.

Photomicrographs of stained sections were acquired using a Zeiss AxioImager Z2 microscope at 10x magnification, providing high-resolution images for subsequent analysis. Myelination levels were quantified by measuring the optical density (OD) of LFB staining in predefined regions of interest, including the cerebral cortex, corpus callosum, internal capsule, hippocampus, caudoputamen, and cerebellar white matter. The analysis was performed using ImageJ software, which allows for accurate measurement of myelin content in different brain structures.

For statistical analysis, data were processed using Statistica 10.0 software, using the general linear model (GLM) to compare differences between groups. Fisher's LSD post hoc tests were performed to determine specific group differences, with statistical significance set at $p \leq 0.05$. All data were tested for normality and homogeneity of variance to ensure the validity of parametric statistical approaches.

Results

Mice with the CNTN6^{-/-} genotype exhibited significantly lower mean Luxol Fast Blue (LFB) optical density (OD) in both males and females, indicating a general reduction in myelination across the brain. However, these differences were notably more pronounced in males (11 % reduction) compared to females (5 % reduction) (Fig. 1 A), suggesting potential sex-related differences in compensatory mechanisms. This observation raises interesting questions about the role of sex hormones and genetic factors in the modulation of myelination processes.

Statistical analysis revealed significant reductions in LFB OD in several key brain structures when comparing CNTN6^{-/-} mice to control C57Bl/6 mice. The most pronounced differences were observed in the corpus callosum (11.22 %, $p < 0.001$), cerebral cortex (12.81 %, $p < 0.001$), internal capsule (9.74 %, $p < 0.001$), and caudoputamen (9.15 %, $p < 0.001$) (Fig. 1 B). These findings suggest that white matter tracts and myelinated gray matter regions are particularly affected by CNTN6 deletion, with extensive disruptions in both the pathways linking different brain regions and the areas responsible for motor control and cognitive functions.

In males, the reduction in LFB OD was significant across all analyzed brain structures, indicating a widespread deficiency in myelination. This suggests that the absence of CNTN6 disrupts myelin integrity in a broad range of brain regions, which may have implications for neural communication and function. In contrast, in females, the differences were less pronounced, and in the least myelinated gray matter structures, such as the cerebral cortex and hippocampus, the observed reductions did not reach statistical significance. These results may reflect a degree of sex-dependent neuroprotection, potentially linked to hormonal influences, such as estrogen, or compensatory mechanisms that mitigate the impact of CNTN6 deletion in females. These findings highlight the need for further investigation into the role of sex differences in myelination and the potential for sex-specific therapeutic approaches.

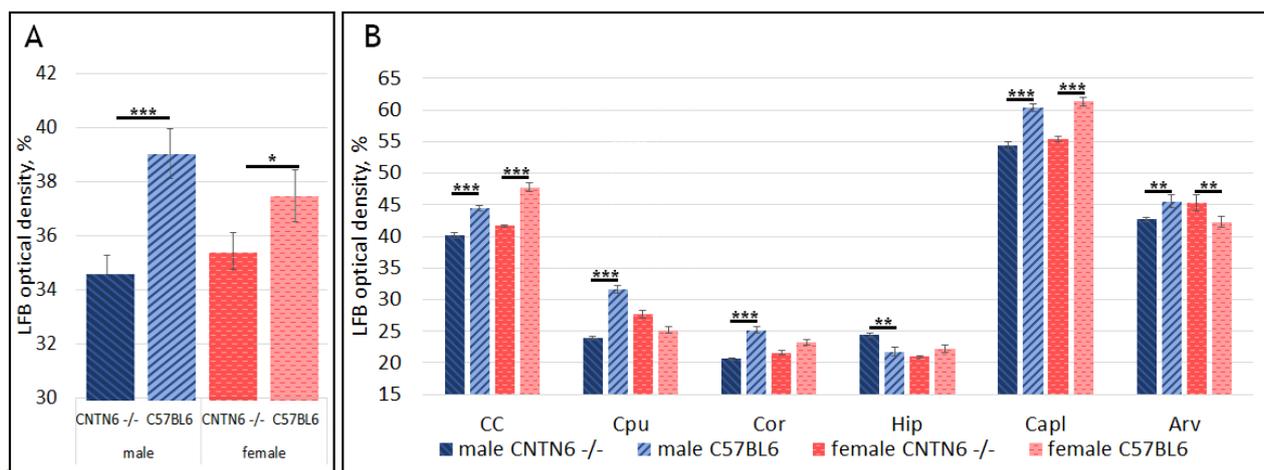


Fig. 1. The LFB OD measurements in CNTN6 -/- and C57Bl6 mice: A) averaged LFB OD; B) LFB OD in separate brain structures including CC – corpus callosum, CPu – caudate putamen, Cor – cortex, Hip – hippocampus, Cap1 – internal capsule, Arv – white matter of the cerebellum. The significant differences between CNTN6 -/- and C57Bl6 lines:

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Conclusion

Our study found a significant reduction in myelination of the corpus callosum, caudate putamen, cortex, hippocampus, and cerebellum in CNTN6-/- mice, potentially explaining their impaired learning and motor coordination [1]. In females, the changes were less pronounced, suggesting compensatory mechanisms linked to sex hormones [2].

Despite the absence of structural abnormalities on MRI, reduced myelin may still contribute to cognitive and behavioral impairments observed in patients with CNTN6 mutations, as white matter integrity is essential for efficient neural communication [3–7]. Our findings confirm CNTN6's essential function in myelination and its potential involvement in neuropsychiatric diseases, including autism spectrum disorders, intellectual disability, and schizophrenia. Further research is needed to explore CNTN6-related myelination deficits and potential therapeutic strategies.

References

1. Takeda Y. et al. Impaired motor coordination in mice lacking neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup // *J Neurobiol.* J Neurobiol. – 2003. – Vol. 56, № 3. – P. 252–265.
2. Breton J.M. et al. Hormonal Regulation of Oligodendrogenesis II: Implications for Myelin Repair // *Biomolecules.* MDPI AG. – 2021. – Vol. 11, № 2. – P. 290.
3. Mu D. et al. Cntn6 deficiency impairs allocentric navigation in mice // *Brain Behav.* John Wiley and Sons Ltd. – 2018. – Vol. 8, № 6.
4. Lopatkina M.E., Kashevarova A.A., Lebedev I.N. Estimation of association of CNTN6 copy number variation with idiopathic intellectual disability // *Russ J Genet.* Maik Nauka Publishing. – 2016. – Vol. 52, № 9. – P. 1004–1006.
5. Repnikova E.A. et al. CNTN6 copy number variations: Uncertain clinical significance in individuals with neurodevelopmental disorders // *Eur J Med Genet.* Elsevier Masson SAS. – 2020. Vol. 63, № 1.
6. Huang A.Y. et al. Rare Copy Number Variants in NRXN1 and CNTN6 Increase Risk for Tourette Syndrome // *Neuron.* Neuron. – 2017. – Vol. 94, № 6. – P. 1101-1111.e7.
7. Mercati O. et al. CNTN6 mutations are risk factors for abnormal auditory sensory perception in autism spectrum disorders // *Molecular Psychiatry* 2016 22:4. Nature Publishing Group. – 2016. – Vol. 22, № 4. – P. 625–633.

УДК 577.29

Алгоритм идентификации пенистых макрофагов в микроокружении опухоли

К.Д. Шалыгина¹, Е.О. Шмакова^{1,2}, Т.С. Сударских¹

Научный руководитель: к.м.н. И.В. Ларионова^{1,2}

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет

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

²Томский национальный исследовательский медицинский центр, НИИ онкологии,

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

E-mail: kseniia_kolmogorova@mail.ru

Algorithm for the identification of foam macrophages in the tumor microenvironment

K.D. Shalygina¹, E.O. Shmakova^{1,2}, T.S. Sudarskikh¹

Scientific Supervisor: PhD., I.V. Larionova^{1,2}

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

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

E-mail: kseniia_kolmogorova@mail.ru

Abstract. A bioimage analysis algorithm was developed to identify foam macrophages in the tumor microenvironment. The relative number and expression level of the general-macrophage marker CD68 in foam macrophages in colorectal, breast and ovarian cancer was analysed.

Key words: foam cells, colon cancer, breast cancer, ovarian cancer.

Введение

Онкологические заболевания остаются острой медико-социальной проблемой как в России, так и во всем мире [1]. Проблема обнаружения новых эффективных маркеров и мишеней для улучшения терапевтических подходов в лечении онкологических заболеваний не теряет своей актуальности. Опухлеассоциированные макрофаги (ОАМ) являются ключевыми клетками врожденного иммунитета в опухолевом микроокружении, которые способствуют опухолевой прогрессии [2]. Ранее было обнаружено, что ОАМ, нагруженные липидами (пенистые макрофаги), представляют собой субпопуляцию ОАМ, которая участвует в поглощении липидов и способствует процессам окисления жирных кислот и окислительного фосфорилирования, которые являются метаболическими характеристиками проопухолевого фенотипа [3]. Однако на сегодняшний день роль пенистых макрофагов в патогенезе онкологических заболеваний остается не изученной.

Цель исследования: разработать алгоритм для выявления пенистых макрофагов и оценки уровня экспрессии общего маркера макрофагов CD68.

Экспериментальная часть

В данном исследовании использовался клинический материал биобанка НИИ онкологии Томского НИМЦ, полученный при проведении оперативного лечения пациентов с 3 типами нозологий: колоректального рака (КРР) (N = 100), рака молочной железы (РМЖ) (N = 80) и рака яичника (РЯ) (N = 150) всех стадий. Иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов опухолей осуществлялось по стандартной методике с последующей оцифровкой на гистоскане Leica Aperio AT2. Наличие пенистых макрофагов в опухолевом микроокружении определялось с использованием ПО Qupath. Также определялась цитоплазматическая экспрессия CD68 в пенистых макрофагах.

Обработка полученных данных выполнялась с использованием программного пакета «GraphPad Prism 8.0». Применялись тест Манна-Уитни для независимых выборок, а также χ^2 -критерий Пирсона. Различия считали значимыми при уровне значимости p-value менее 0,05.

Результаты

В результате анализа гистологического материала, полученного от пациентов с КРР РМЖ, РЯ, было выявлено, что пенистые макрофаги чаще всего встречались у пациентов с РЯ (в 36 % случаев), при КРР и РМЖ пенистые макрофаги встречались в 12 % случаев. С использованием ПО Qipath был разработан алгоритм с применением технологии искусственного интеллекта (ИИ) (рис. 1), позволяющий выявлять пенистые макрофаги, включающий следующие этапы:

- 1) оптимизация параметров детектирования клеток;
- 2) классификация детектированных клеток (Random Trees);
- 3) анализ экспрессии CD68.

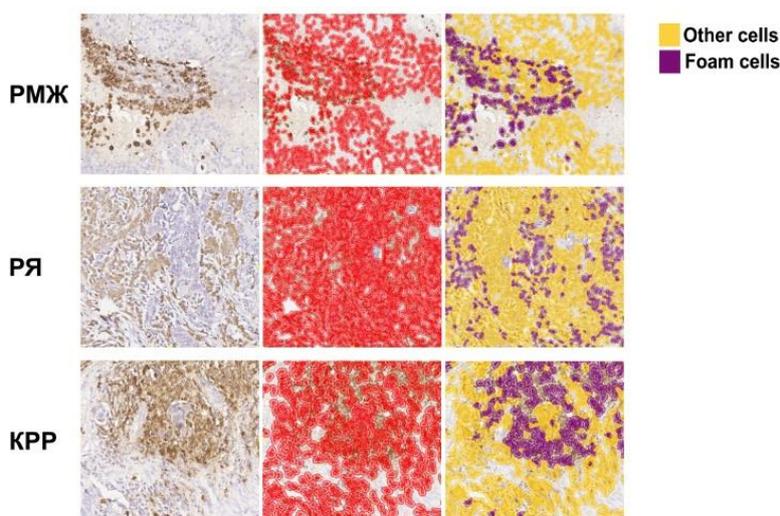


Рис. 1. Механизм обнаружения пенистых макрофагов с помощью ПО Qipath

В результате проведенного статистического анализа были выявлены значимые различия относительного количества пенистых макрофагов (рис. 2) при РЯ по сравнению с РМЖ (2,42 [0,02;52,83] vs 0,84 [0,13;5,63], $p=0,0352$).

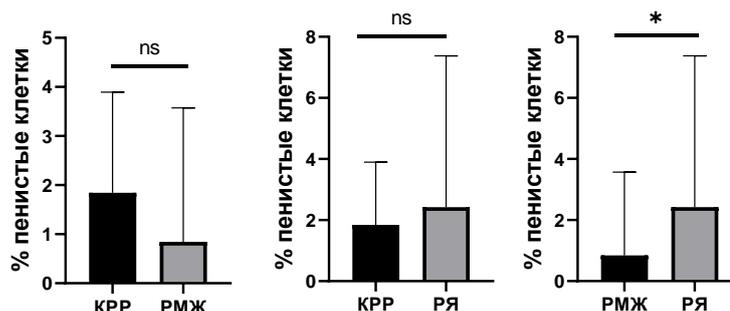


Рис. 2. Результаты анализа процентного соотношения пенистых макрофагов к общему количеству клеток в опухолевом материале больных КРР, РМЖ и РЯ.
ns – различия статистически незначимы, $p>0,05$; * – статистически значимые различия при $p < 0,05$

Так же на уровне тенденции (рис. 2) наблюдалось повышение содержания пенистых клеток при КРР по сравнению с РМЖ (1,84 [0,29;10,38] vs 0,84 [0,13; 5,63], $p = 0,0779$).

При количественном анализе экспрессии общего маркера макрофагов CD68 в пенистых макрофагах опухоли КРР, РМЖ и РЯ (рис. 3) было обнаружено, что экспрессия CD68

статистически значимо ниже при РЯ в сравнении с РМЖ (127,30 [22,93;261,10] vs 295,80 [281,6;299,3], $p < 0,0001$) и КРР (127,30 [22,93;261,10] vs 283,60 [131,30;295,70], $p < 0,0001$).

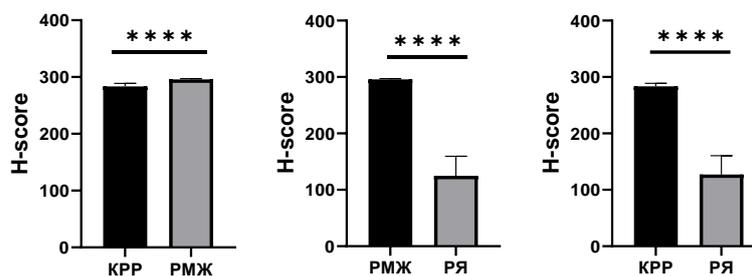


Рис. 3. Результаты анализа общей белковой экспрессии CD68 в опухолевом материале больных КРР, РМЖ и РЯ. **** – статистически значимые различия при $p < 0,0001$

Анализ данных с использованием χ^2 -критерия Пирсона показал, что у пациентов с РЯ существует статистически значимая связь между наличием пенистых макрофагов и развитием отдаленных метастазов ($p < 0,0001$).

Заключение

В результате исследования был разработан алгоритм выявления и подсчета пенистых макрофагов, а также определения экспрессии CD68 в микроокружении КРР, РМЖ, РЯ. У пациентов с РЯ наблюдалась более обильная инфильтрация пенистыми макрофагами, но с более низкой экспрессией CD68 по сравнению с другими проанализированными раками. Наличие пенистых макрофагов у пациентов с РЯ коррелировало с развитием отдаленных метастазов.

Дальнейший анализ морфологии и оценка распространенности пенистых макрофагов позволят получить важные данные об их роли в прогрессии колоректального рака, рака молочной железы и рака яичника.

Работа поддержана грантом РФФИ №24-25-00455 «Пенистые макрофаги в опухолевом микроокружении: вклад в канцерогенез и механизм формирования».

Список литературы

1. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна и др. – М. : МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023. – 275 с.
2. Chen Y., et al. CD36, a signaling receptor and fatty acid transporter that regulates immune cell metabolism and fate // Journal of Experimental Medicine. – 2022. – Vol. 219. № 6. doi.org/10.1084/jem.20211314.
3. Larionova I. et al. Tumor-associated macrophages in human breast, colorectal, lung, ovarian and prostate cancers // Frontiers in oncology. – 2020. – Vol. 10. – P. 566511. doi.org/10.3389/fonc.2020.566511.

УДК: 618.19-006-091.8:575.113

Химиоиндуцированная активность генов гомологичной рекомбинации в опухолевых клетках молочной железы**Ж. Шарипханова^{1,2}, А.А. Баянбаева^{1,2}, А.А. Фролова¹**

Научный руководитель: к.б.н. М.М. Цыганов

¹Томский национальный исследовательский медицинский центр, НИИ онкологии
Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009²Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России
Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050E-mail: sharipkhanova.zhansaya@bk.ru**Chemotherapy-induced activity of homologous recombination genes in breast tumor cells****Zh. Sharipkhanova^{1,2}, A.A. Bayanbaeva^{1,2}, A.A. Frolova¹**

Scientific Supervisor: Ph.D. M.M. Tsyganov

¹Tomsk National Research Medical Center, RI Cancer Russia, Tomsk, Kooperativny str, 5, 634009²Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow tract, 2, 634050E-mail: sharipkhanova.zhansaya@bk.ru

Abstract. *The compensatory mechanism for homologous recombination (HR) deficiency may be based on the reversal of HR gene abnormalities to a normal state, which may be associated with the development of chemotherapy resistance in tumor cells. A drug resistance model was established using two drugs – cisplatin and docetaxel – on breast cancer cell cultures: MCF-7, MDA-MB-231, and MDA-MB-468. The expression level of HR genes was assessed using RT-PCR. Chromosomal aberrations were evaluated using microarray analysis. In MCF-7 under the influence of cisplatin, restoration of normal copy number of BRCA1, CDK12, CHEK1, RAD51D was shown, as well as appearance of amplifications in BRCA2 and PALB2. In MDA-MB-231, amplifications appeared in BRCA1, BRIP1, FANCL, RAD51B, PARP1 genes. MDA-MB-468 does not change under the influence of cisplatin. The level of gene expression varies according to changes in chromosomal aberrations. Docetaxel has no effect on cell cultures.*

Key words: *breast cancer, cell cultures, BRCAness, homologous recombination deficiency, expression, deletion, amplification, reversion.*

Введение

Формирование *BRCA*-подобных опухолей возможно за счет наличия дефицита гомологичной рекомбинации (ДГР), который обусловлен мутациями, делециями в генах гомологичной рекомбинации (ГР), метилированием промоторов и другими механизмами down-регуляции экспрессии и это может иметь отражение в эффективности химиотерапии ДНК-повреждающими агентами [1]. Но не всегда наблюдается прямая связь наличия ДГР с эффективностью лечения. На наш взгляд, при проведении химиотерапии может происходить реверсия и восстановление функциональной активности как гена *BRCA1*, так и других генов системы ГР, что и приводит к формированию химиорезистентности опухоли [2]. Данный феномен был показан на клиническом материале, но для доказательства восстановления функциональности процесса ГР под действием химиопрепаратов на клеточных линиях рака молочной железы человека необходимо проведение экспериментов *in vitro*. Таким образом, цель работы явилась оценка изменения наличия aberrаций числа копий ДНК и экспрессионного профиля основных генов гомологичной рекомбинации в клеточных моделях рака молочной железы под действием цисплатина и доцетаксела.

Экспериментальная часть

Исследование было проведено на культурах опухолевых клеток рака молочной железы: MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468. Модель лекарственной устойчивости на клетках была получена для двух препаратов – цисплатин и доцетаксел. Каждую клеточную культуру инкубировали с химиопрепаратом до 3 раз включительно. На каждой точке инкубации из клеточной суспензии выделяли РНК и ДНК с помощью набора RNeasy Plus mini Kit и QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany), соответственно. Уровень экспрессии генов гомологичной рекомбинации оценивали при помощи ОТ-ПЦР. Для оценки наличия хромосомных aberrаций (Loss - делеция, Gain - амплификация) проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах.

Результаты

Для определения изменений спектра нарушений генов гомологичной рекомбинации при индукции резистентности к препаратам платины и таксанам условно были отобраны клеточные линии с наличием дефицита гомологичной рекомбинации (MCF-7 и MDA-MB-231) и без такового (MDA-MB-468) (табл. 1). При отборе клеточных культур мы оценили наличие хромосомных aberrаций в исследуемых генах (таблица 1) и их экспрессии (рис. 1).

Таблица 1

Наличие хромосомных aberrаций в генах системы гомологичной рекомбинации в исследуемых клеточных культурах MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468

Гены/кл. культура	MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-468
<i>BRCA1</i>	Loss	n	n
<i>BRCA2</i>	n	Loss	n
<i>ATM</i>	Loss	n	Gain
<i>BARD1</i>	n	Loss	n
<i>BRIP1</i>	Gain	n	n
<i>CDK12</i>	Loss	n	n
<i>CHEK1</i>	Loss	n	Gain
<i>CHEK2</i>	n	Loss	n
<i>FANCL</i>	n	n	n
<i>PALB2</i>	n	Loss	n
<i>PPP2R2A</i>	n	n	n
<i>RAD51B</i>	Gain	n	n
<i>RAD51C</i>	Gain	n	n
<i>RAD51D</i>	Loss	n	n
<i>RAD54L</i>	n	Loss	Gain
<i>PARP1</i>	n	n	Gain
Частота Loss	5 (31,2%)	5 (31,2%)	0 (0,0%)
Частота n	8 (50,0%)	11 (68,8%)	12 (75,0%)
Частота Gain	3 (18,8%)	0 (0,0%)	4 (25,0%)
Наличие ДГР	Есть	Есть	Нет

Из табл. 1 хорошо видно, что в клеточных культурах MCF-7 и MDA-MB-231 наблюдается наличие делеций в 31,2 % случаев (в том числе и в *BRCA1*), что также соотносится с экспрессионным портретом (рис. 1). Тогда как для MDA-MB-468 показано полное отсутствие делеций и наличие в 25 % случаев амплификаций генов *ATM*, *CHEK1*, *RAD54L* и *PARP1*, что также коррелирует с высокой экспрессией данных генов (рис. 1). Таким образом, согласно рабочей гипотезе, предполагается, что в клеточной культуре с наличием ДГР под действием препаратов будет происходить сужении спектра нарушений генов гомологичной рекомбинации и возможное развитие структурной и функциональной компенсаторности ДГР, что и приводит к развитию резистентности к ДНК-повреждающим агентам.

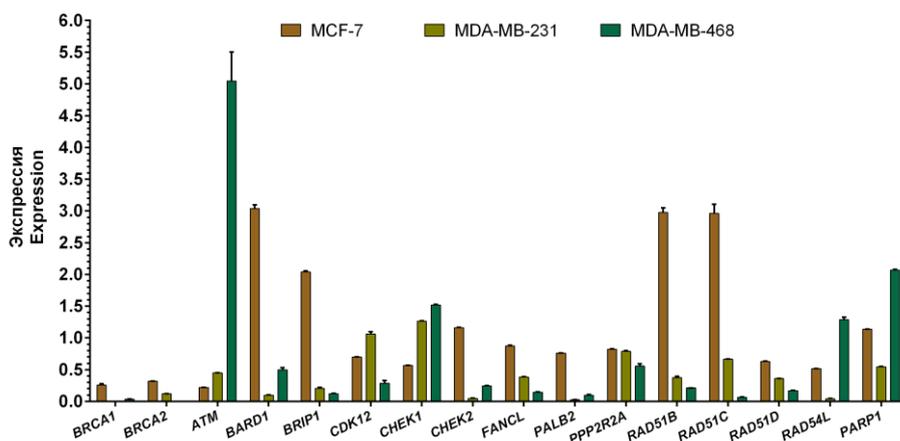


Рис. 1. Начальный уровень экспрессии генов системы гомологичной рекомбинации в исследуемых клеточных культурах

Для MCF-7 показано сужение спектра нарушений *BRCA1*, *CDK12*, *CHEK1* и *RAD51D* (восстановление нормальной копииности). Для *BRCA2* и *PALB2* выявлено появление амплификаций. Так же показано, что происходит увеличение экспрессии генов *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *RAD51D* от нативного варианта к 3 пассажу клеточной культуры с цисплатином. Что интересно, доцетаксел не имеет такого действия и частота aberrаций числа копий ДНК не изменяется. Аналогичный результат показан для MDA-MB-231. Установлено, что все выявленные локусы с делециями, где локализованы гены *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* и *RAD54L* с течением времени под действием цисплатина восстанавливаются до нормальной копииности. При этом для остальных генов наблюдается увеличение копииности. Появление амплификаций в исследуемых генах наблюдается сразу после 1 пассажа и сохраняется на протяжении всего действия препарата. На последнем этапе была проанализирована клеточная культура MDA-MB-468. Под действием цисплатина происходит увеличение копииности только гена *BRCA1*. Через 24 часа и после 1 пассажа детектируются делеции в генах *PALB2* и *PPP2R2A*, но на 2 и 3 пассаже они элиминируются. Действие доцетаксела полностью не оказывает влияния на данную клеточную культуру.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования на клеточных моделях было показано, что наличие aberrантного состояния генов системы гомологичной рекомбинации оказывает существенное влияние на чувствительность и эффективность применяемого химиопрепарата, а также участвует в развитии структурной и функциональной компенсаторности ДГР, что скорее всего приводит к развитию резистентности к ДНК-повреждающим агентам.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-15-00169.

Список литературы

1. Turner N.C., Reis-Filho J.S. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25, №. 43. – P. 5846–5853.
2. Sokolenko A.P. et al. Rapid selection of BRCA1-proficient tumor cells during neoadjuvant therapy for ovarian cancer in BRCA1 mutation carriers // *Cancer letters*. – 2017. – Vol. 397. – P. 127–132.

УДК 575.1

Биоинформатический анализ паттернов метилирования в геноме образцов ворсин хориона при различных патологиях беременности

Д.Г. Шевцов, А.Ю.Зуев, О.Ю. Васильева

Научный руководитель: д.б.н. С.А. Васильев

Томский национальный исследовательский медицинский центр, НИИ медицинской генетики
Россия, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10, 634050

E-mail: daniil.shevtsov@medgenetics.ru

Bioinformatic analysis methylation patterns in the genome of samples with various pregnancy pathologies

D.G. Shevtsov, A.Yu.Zuev, O.Yu. Vasilyeva

Scientific Supervisor: Dr. S.A. Vasilyev

Tomsk National Research Medical Center, Research Institute of Medical Genetics
Russia, Tomsk, Nab. r. Ushayki, 10, 634050

E-mail: daniil.shevtsov@medgenetics.ru

Abstract. Reproductive losses in humans are an extremely common event. Some of the factors leading to death in embryonic development remain unexplained. DNA methylation affects many physiological processes, including the physiological course of pregnancy. The aim of the study was to find out whether there are common patterns of changes in the level of methylation for several pregnancy pathologies. The data obtained from the analysis of chorionic trophoblast samples from spontaneous and medical abortions were used as research material, as well as publicly available datasets with pathologies such as habitual miscarriage, placental insufficiency, premature birth, and preeclampsia. Data from RRBS sequencing of spermatozoa, oocytes, and trophectoderm were also taken for analysis. During the global methylation wave, a significant proportion of both hypomethylated (41 %) and hypermethylated (45 %) DMR pathologies coincide with regions unique to this wave, indicating the importance of this period in establishing methylation patterns.

Key words: epigenetic, methylation, placenta.

Введение

Репродуктивные потери у человека являются крайне частым событием. Демографические исследования показали, что шансы произвести жизнеспособное потомство у женщины среднего репродуктивного возраста в пределах одного менструального цикла не превышают 25 % [1]. Часть факторов, ведущих к летальному исходу в эмбриональном развитии, остаются невыясненными. Метилирование ДНК (5-метилцитозин) является основной формой модификации ДНК в геноме млекопитающих и стабильно поддерживается в соматических тканях. [2]. Метилирование может вносить существенный вклад в регуляцию экспрессии генов, подавление мобильных элементов генома [3]. Аномальное метилирование ДНК генов, специфичных для плаценты, может прямо или косвенно влиять на имплантацию, рост и развитие эмбриона, приводя к множественным аномалиям беременности [4]. Цель данной работы – провести анализ изменения паттернов метилирования в геноме образцов зародышевой части плаценты при различных патологиях беременности.

Экспериментальная часть

В качестве материала для исследования использовали данные RRBS секвенирования, полученные в результате анализа образцов ворсин хориона спонтанных и медицинских абортусов из биобанка НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ «Биобанк населения Северной Евразии». После первичного анализа абортусов отобрали образцы с повышенным (highLINE, n = 3) и с пониженным (lowLINE, n = 4) уровнем метилирования относительно

медицинских абортусов (группа контроля). Для проведения исследования также использовали доступные в открытом доступе наборы данных из нескольких исследований [5–8]. В отмеченных исследованиях рассмотрено изменение уровня метилирования при следующих патологиях: привычном невынашивании беременности [6], преждевременных родах [5], преэклампсии (ПЭ) [7, 8], задержке внутриутробного роста [8], спонтанном аборте. Для анализа так же были взяты данные RRBS секвенирования сперматозоидов, ооцитов и трофэктодермы [9].

Результаты

Данные, полученные из открытых источников и являющиеся результатами исследований с использованием метилочипов (Infinium HumanMethylation450 BeadChip; Illumina Methylation EPIC Bead Chip), были представлены в виде дифференциально-метилированных сайтов. Для дальнейшего анализа для каждой из рассматриваемых патологий все данные были приведены к виду дифференциально метилированных регионов (ДМР, участки генома по 100000 п.н.), среди которых были выделены гипо- и гиперметилированные ДМР с отличиями индекса метилирования между опытной и контрольной группами больше 0,2 (FDR < 0,05) (табл. 1).

Таблица 1

Количество детектированных гипометилированных и гиперметилированных регионов генома в группах рассматриваемых патологий беременности

Рассматриваемые патологии	Количество гиперметилированных регионов	Количество гипометилированных регионов
ЕОРЕ (преэклампсия с ранним началом)	6	2
IUGR (задержка внутриутробного роста)	1	3
ЛОРЕ (поздняя преэклампсия)	2	0
РЕ (преэклампсия)	2	2
РТВ (преждевременные роды)	29	59
RM (привычное невынашивание беременности)	380	127
hL (группы с повышенным уровнем метилирования LINE в спонтанных абортусах)	3618	2307
lL (группы с пониженным уровнем метилирования LINE в спонтанных абортусах)	4463	3977

В дальнейшем определили участки генома, которые во время волны глобального деметилирования на стадии дробления снижают свой уровень метилирования, для этого сравнили данные, полученные из сперматозоидов и ооцитов, с профилем метилирования трофэктодермы эмбрионов на стадии бластоцисты. Для определения регионов генома, для которых в последующем повышается уровень метилирования при установлении тканеспецифичного уровня метилирования в ворсинах хориона, были сравнены профили метилирования геномов в трофэктодерме эмбрионов на стадии бластоцисты [9] и медицинских абортусов в первом триместре беременности. Полученные участки генома для волн эпигенетического репрограммирования сравнили с ДМР, различных патологий. В дальнейшем рассчитали долю уникальных ДМР, которые пересекаются с регионами волн глобально метилирования и деметилирования (табл. 2).

Таблица 2

Доля детектированных гипометилированных и гиперметилированных регионов генома в группах рассматриваемых патологий беременности, которые пересекаются с уникальными регионами, которые изменяют уровень метилирования во время волн эпигенетического репрограммирования

Рассматриваемые патологии	Волна глобального деметилирования				Волна глобального метилирования	
	Уникальные регионы ооцитов		Уникальные регионы сперматозоидов		Гиперметилированные, доля	Гипометилированные, доля
	Гиперметилированные, доля	Гипометилированные, доля	Гиперметилированные, доля	Гипометилированные, доля		
РТВ	0	0	0,276	0,203	0,207	0,271
RM	0,008	0	0,147	0,118	0,300	0,370
hL	0,001	0,001	0,124	0,109	0,384	0,450
IL	0,002	0,002	0,109	0,113	0,412	0,410

Значительная доля данных регионов для сперматозоидов совпадала с ДМР патологий беременности, при этом данные ДМР были гиперметилированы, что может указывать на ошибки, во время процесса снятия меток метилирования, которые могут приводить к возникновению аномалий метилирования и различных патологий. В ДМР патологий беременности, которые совпадали с уникальными для волны глобального метилирования регионами, наблюдалась значительная доля гипер- (максимум 45 %) и гипометилированных регионов (максимум 41 %). Наличие такого количества ДМР может указывать на нарушение паттернов добавления меток метилирования, что может приводить к как к гиперметилированию, так и к гипометилированию регионов генома физиологичное функционирование, которых необходимо для роста и развития эмбриона.

Заключение

Полученные в ходе анализа данные указывают на то, что одним из узких мест появления аномалий метилирования могут являться волны эпигенетического репрограммирования генома, нарушение паттернов установления уровня метилирования в которых, может влиять на развитие эмбриона, приводя к возникновению множественных патологий беременности. Значительная доля рассматриваемых ДМР патологий сосредоточена в участках генома, уровень метилирования которых изменяется во время волн эпигенетического репрограммирования, что указывает на то, что многие аномальные изменения в уровне метилирования могут появляться ещё на самых ранних стадиях развития. Для волны глобального деметилирования характерно, что достаточная доля ДМР (до 27 %), как гипо-, так и гиперметилированных, рассматриваемых патологий сконцентрирована в регионах отцовского генома. В регионах уникальных для волны глобального метилирования наблюдается вплоть до 45 % от всех анализируемых ДМР рассматриваемых патологий.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 21-15-00341.

Список литературы

1. Edmonds D. K. et al. Early embryonic mortality in women // Fertility and sterility. – 1982. – Т. 38, № 4. – Р. 447–453.
2. Zeng Y., Chen T. DNA methylation reprogramming during mammalian development // Genes. – 2019. – Vol. 10, № 4. – Р. 257.
3. Goll M.G., Bestor T.H. Eukaryotic cytosine methyltransferases // Annu. Rev. Biochem. – 2005. – Vol. 74. – Р. 481–514.
4. Song X. et al. Differential methylation of genes in the human placenta associated with bisphenol A exposure // Environmental Research. – 2021. – Vol. 200. – Р. 111389.

5. Brockway H.M. et al. Characterization of methylation profiles in spontaneous preterm birth placental villous tissue // *PloS one*. – 2023. – Vol. 18, № 3. – P. e0279991.
6. Matsumoto Y. et al. Characteristic DNA methylation profiles of chorionic villi in recurrent miscarriage // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 11673.
7. Konwar C. et al. DNA methylation profiling of acute chorioamnionitis-associated placentas and fetal membranes: insights into epigenetic variation in spontaneous preterm births // *Epigenetics & Chromatin*. – 2018. – Vol. 11. – P. 1–14.
8. Guo H. et al. The DNA methylation landscape of human early embryos // *Nature*. – 2014. – Vol. 511, № 7511. – P. 606–610.

УДК 612.59

**Влияние регулярных холодовых экспозиций на возрастную динамику экспрессии
разобщающего белка UCP1 в жировых депо мышей**

А.В. Якуненок, В. А. Кудинова

Научный руководитель: доцент, к.б.н. Е.И. Елсукова

Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева

Россия, г. Красноярск, ул. Ады Лебедевой, 89, 660049

E-mail: avy0905@yandex.ru

**Effect of intermittent cold exposures on age-related dynamics of UCP1 expression
in adipose depo of mice**

A.V. Yakunenkov, V. A. Kudinova

Scientific Supervisor: Ass. Prof., Ph.D. E.I. Elsukova

Krasnoyarsk state pedagogical university named after V.P. Astafev, Russia, Krasnoyarsk, Ada

Lebedeva str., 89, 660049

E-mail: avy0905@yandex.ru

Abstract. *The work presents a comparative analysis of the dynamics of thermogenic potential of interscapular brown adipose tissue, beige adipogenesis in the subcutaneous inguinal and perigonadal abdominal fat depots in laboratory mice under conditions of a 16-week course of regular cold exposures (6 h/day at 6 °C) and under standard temperature conditions (23 °C). Expression of the main thermogenic marker of brown and beige adipocytes, the uncoupling protein UCP1, was estimated using Western blotting. In the experimental group of mice, UCP1 protein was present on all blots of inguinal adipose tissue throughout the experiment, a weak band of UCP1 was determined on 20–40 % of blots of gonadal adipose tissue. In the control group, UCP1 protein was almost undetectable in fat depots. Total tissue protein in experimental samples of interscapular brown fat and inguinal fat increased by the end of the experiment when calculated both per mg of tissue and for the entire tissue, and did not change in gonadal adipose tissue. Thus, regular cold exposures inhibit age-dependent inhibition of beige adipogenesis, stimulate growth of thermogenic potential in both classical brown and white adipose tissues.*

Key words: *intermittent cold exposure, protein UCP1, brown and white adipose tissues, thermogenic potential.*

Введение

Бурая жировая ткань (БЖТ) и популяции индуцибельных бежевых адипоцитов в подкожном жировом депо являются специализированными эффекторами термогенеза, основанного на разобщении окислительного фосфорилирования и дыхания посредством разобщающего белка UCP1 (uncoupling protein 1) [1]. Бурый и бежевый адипогенез, термогенез в этих тканях максимальны в раннем онтогенезе, снижаясь в дальнейшем по мере роста и развития организма. В подкожном жировом депо темпы снижения экспрессии UCP1 вплоть до полного прекращения значительно ускоряются после полового созревания [2]. Хроническая адаптация к низким температурам среды сдерживает эту возрастную редукцию термогенного потенциала бежевой жировой ткани [3]. Менее изучено влияние на термогенный резерв жировых тканей регулярно повторяющихся краткосрочных холодовых экспозиций, хотя суточные градиенты температур - нормальное явление даже в регионах с мягким климатом, и быстро реагирующий малоинерционный механизм UCP1-зависимого термогенеза представляется более оптимальным для адаптации к температурным градиентам.

Целью работы был анализ динамики термогенного потенциала бурой жировой ткани, бежевого адипогенеза подкожного и абдоминального жировых депо в условиях регулярных холодовых экспозиций и в стандартных температурных условиях.

Экспериментальная часть

Эксперименты выполнены на самцах аутбредных мышей линии ICR из питомника ГНЦ ВБ Вектор (Новосибирск). Животные содержались при постоянной температуре 23 ± 2 °C со свободным доступом к корму БиоПро (Новосибирск). Экспериментальная группа с 1,5-мес возраста (период полового созревания) высаживалась 5 дней в нед на 6 ч в камеру с 6 °C. Для предотвращения холод-индуцированной гиперфагии корм предоставлялся в количестве, потребляемом контрольной группой. Вывод животных из эксперимента осуществлялся через 3 нед (возраст 2 мес) и через 16 нед (возраст 6 мес). Тканевые гомогенаты межлопаточной бурой жировой ткани (МБЖТ), подкожной паховой (ПБелЖТ) и окологонадной белой жировой ткани (ГБелЖТ) готовили в буфере 0,01 М трис-HCl с 1 mM ЭДТА и добавлением 1 mM PMSF в качестве ингибитора протеаз, pH = 7,2. Общий белок в гомогенатах тканей определяли модифицированным методом Лоури [2]. Разобщающий белок UCP1 определяли с помощью вестерн-блоттинга [2]. Использовали препараты первичных антител к UCP1 компании Cloud-Clone Corp. (Китай) и вторичные антитела anti-rabbit IgG Abcam (США). Блоты обрабатывались с помощью ПО ImageJ. Данные представлены как среднее \pm sd. Сравнение двух средних проводилось с помощью U-критерия Манна-Уитни в GraphPadPrism 8.2.1.

Результаты

Показатели массы и общего белка жировых тканей не различались статистически значимо между контрольной и опытной группами после 3 нед адаптации (табл. 1). К концу эксперимента масса МБЖТ у мышей опытной группы была выше, содержание общего белка (мкг/мг) в МБЖТ не различалось между группами.

Таблица 1

Показатели массы и общего тканевого белка

	2-мес контроль n = 5	2-мес опыт, n = 5	6-мес контроль, n = 10	6-мес опыт, n = 9
Масса, г	34,1 \pm 1,14	32,3 \pm 3,93	42,84 \pm 2,34 ^a	41,52 \pm 2,73 ^c
МБЖТ, отн. масса, %	0,35 \pm 0,09	0,4 \pm 0,07	0,28 \pm 0,05	0,4 \pm 0,08 ^b
ПБелЖТ, отн. масса, %	0,78 \pm 0,26	1,02 \pm 0,21	0,51 \pm 0,14	0,61 \pm 0,19 ^c
ГБелЖТ, отн. масса, %	1,09 \pm 0,18	1,48 \pm 0,4	1,17 \pm 0,73	0,77 \pm 0,5 ^c
Общий белок МБЖТ, мкг/мг	183 \pm 44,03	212,5 \pm 26,57	143,4 \pm 40,8	158,4 \pm 50,82
Общий белок ПБелЖТ, мкг/мг	67,65 \pm 2,84	90,65 \pm 45,24	26,7 \pm 12,54 ^a	55,36 \pm 25,2 ^b
Общий белок ГБелЖТ, мкг/мг	24,42 \pm 10,15	22,58 \pm 4,29	14,12 \pm 7,71	37,71 \pm 34,74
Общий белок МБЖТ, мкг/ткань	21440 \pm 4940	28388 \pm 1907	16852 \pm 3521	25416 \pm 6087 ^b
Общий белок ПБелЖТ, мкг/ткань	17953 \pm 5385	27856 \pm 12475	5287 \pm 1906 ^a	13124 \pm 3967 ^{cb}
Общий белок ГБелЖТ, мкг/ткань	9068 \pm 3913	10500 \pm 2503	6216 \pm 3693	7109 \pm 3324

Примечание: $p < 0,05$ – надстрочные буквенные символы: *a* – в сравнении с 2-мес контролем; *b* – в сравнении с 6-мес контролем; *c* – в сравнении с 2-мес опытной группой.

Относительную экспрессию белка UCP1 на блотах не рассчитывали денситометрией из-за крайне слабой экспрессии нагрузочного маркера β -тубулина в пробах жировых тканей и МБЖТ 6-мес мышей. Однако полосы белка UCP1 на блотах опытных мышей имели интенсивность визуально не слабее по сравнению с контрольными блотами (рис. 1). Таким образом, термогенный потенциал МБЖТ у опытных мышей был выше, по крайней мере, за счет роста ткани.

Показатели массы ПБелЖТ и ГБелЖТ в начале эксперимента были незначительно выше в опытной группе. К 6-мес возрасту, наоборот, наблюдалось их статистически значимое снижение до значений, близких к значениям контрольных животных. Ни у 2-мес, ни у 6-мес контрольных мышей белок UCP1 практически не проявлялся на блотах ПБелЖТ и ГБелЖТ. Наоборот во всех опытных пробах ПБелЖТ детектировалась полоса белка UCP1. Слабые полосы белка UCP1 идентифицированы даже в 20 и в 40% проб ГБелЖТ 2-х и 6-ти мес мышей.

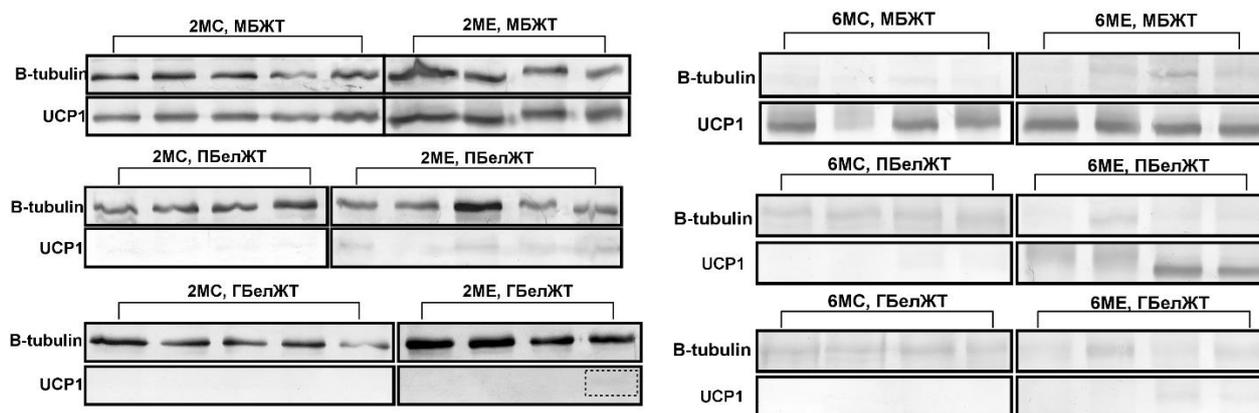


Рис. 1. Репрезентативные блоты белка UCP1 и β -тубулина
2МС и 2МЕ; 6МС и 6МЕ – 2-мес и 6-мес контрольные и опытные блоты

Заключение

Таким образом, начинающиеся в раннем онтогенезе до завершения полового созревания регулярные краткосрочные холодовые экспозиции стимулируют рост бурой жировой ткани, сдерживают возраст-зависимое угнетение бежевого адипогенеза в подкожном и абдоминальном депо. Поскольку снижение экспрессии белка UCP1 рассматривается как одно из ранних событий в развитии возрастных метаболических нарушений в жировых тканях (ЖТ) и организме в целом [4], в дальнейшем представляет интерес выяснение связей между динамикой термогенного потенциала жировых тканей и системного метаболизма при прерывистой холодной адаптации.

Список литературы

1. Cinti S. The adipose organ at a glance // Disease models & mechanisms. – 2012. – Vol. 5, № 5. – P. 588–594.
2. Yakunenkov A.V., Elsukova E.I., Natochy I.O. Age-related expression dynamics of uncoupling protein 1 in adipose tissues of ICR outbred mice during postnatal ontogenesis // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2023. – Vol. 59, № 4. – P. 1020–1026.
3. Jung S.M., Sanchez-Gurmaches J., Guertin D.A. Brown adipose tissue development and metabolism // Brown adipose tissue. – 2019. – P. 3–36.
4. Darcy J., Tseng Y.H. ComBATING aging-does increased brown adipose tissue activity confer longevity? // Geroscience. – 2019. – Vol. 41, № 3. – P. 285–296.

Научное издание

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

Сборник научных трудов
XXII 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