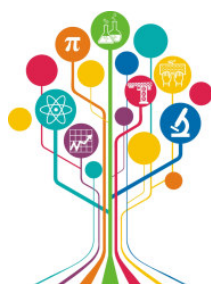


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

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

26–29 апреля 2022 г.

PROSPECTS OF FUNDAMENTAL SCIENCES DEVELOPMENT

Volume 4. Biology and fundamental medicine

Abstracts

XIX International Conference of students, graduate students
and young scientists

April 26–29, 2022



ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

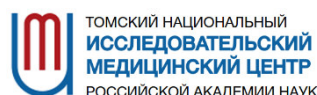


Национальный
исследовательский

Томский
государственный
университет



Томский государственный университет
систем управления и радиоэлектроники



ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Томск 2022

УДК 501:004(063)
ББК 72:32.81л0
П27

П27 **Перспективы развития фундаментальных наук** : сборник трудов XIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Томск, 26–29 апреля 2022 г.) : в 7 томах. Том 4. Биология и фундаментальная медицина / под ред. И.А. Курзиной, Г.А. Вороновой. – Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2022. – 90 с.

ISBN 978-5-4387-1085-1 (т. 4)

ISBN 978-5-4387-1081-3

Сборник содержит труды участников XIX 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 978-5-4387-1085-1 (т. 4)
ISBN 978-5-4387-1081-3

© ФГАОУ ВО НИ ТПУ, 2022

Tomsk International Science Program (TISP) «Molecular engineering»



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

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

Full-time form of education

Duration of study - 4 years

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

Study language - English

Tuition fees: 289,510 rubles a year

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

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

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

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

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

Places for internships for students and subsequent employment of graduates:

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



tisp_tsu



tisp.tsu



tsuTISP

tisp.tsu.ru/apply/



АВТОНОМНАЯ МАГИСТЕРСКАЯ ПРОГРАММА «ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ И БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ»



Химический факультет



САЕ Институт «Умные материалы и технологии»

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

Условия приёма

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

Вступительные испытания: экзамен по химии, собеседование.

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

КЛЮЧЕВЫЕ ДИСЦИПЛИНЫ ПРОГРАММЫ

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

Магистратура «Трансляционные химические и биомедицинские технологии» – ЭТО:

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

КОНТАКТЫ

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

chembiomed.ru [chembiomed](https://t.me/smfi_tsu_bot)



ПРЕИМУЩЕСТВА ПРОГРАММЫ

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

ВЕДУЩИЕ ПРЕПОДАВАТЕЛИ



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



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



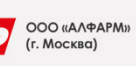
Рыбов Вячеслав Валерьевич
д.м.н., заместитель директора по научной и лечебной работе НИИ кардиологии Томского НИМЦ, и. о. руководителя отделения неотложной кардиологии, профессор кафедры кардиологии ФПК и ППС СибГМУ, в. н. с. лаборатории трансляционной и клеточной биомедицины НИ ТГУ.



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



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



Инженер-технолог

Инженер-разработчик

Инженер-исследователь



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

Дополнительная профессиональная образовательная программа профессиональной переподготовки по теме

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

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

Руководитель программы:

Курзина Ирина Александровна

Kurzina99@mail.ru

Томский государственный университет

САЕ Институт «Умные материалы и технологии»

г. Томск, пр. Ленина, 36



САЕ Институт «Умные материалы и технологии»



ФОНД ИНФРАСТРУКТУРНЫХ И ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ
Группа РОСНАНО

г. Томск

СОДЕРЖАНИЕ

<i>IN VIVO</i> ANTIOXIDANT EFFECTS OF BETULIN IN STREPTOZOTOCIN-NICOTINAMIDE INDUCED DIABETIC RATS F.O. Adepoju, I.F. Gette, I.G. Danilova	8
POTENTIAL PROTECTIVE EFFECT OF CHLORELLA VULGARIS AGAINST ETHANOL-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE Q.N. Okechukwu, O.N. Kanwugu, E.G. Kovaleva	11
ЭПИТЕЛИЙ-ЗАВИСИМЫЕ СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ГЛАДКИХ МЫШЦ ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ Ю.Г. Бирулина, Е.Е. Буйко, М.О. Вольхина	14
ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МУТАНТНЫХ ФОРМЫ ГЛИЦИЛ-tРНК СИНТЕТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА, СВЯЗАННЫХ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ Е.С. Виноградова	17
ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ТРОЙНЫМ НЕГАТИВНЫМ ФЕНОТИПОМ К.А. Гаптулбарова, М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов	20
РОЛЬ NA ⁺ /K ⁺ -АТФАЗЫ В МЕХАНИЗМАХ ОБЪЕМ-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ КРЫСЫ Е.А. Голованов, В.С. Гусакова	23
ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ НА СПОСОБНОСТЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЛИНИЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К ИНДУКЦИИ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ДО СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ОБРАЗОВАНИЕМ МАММОСФЕР Д.С. Долгашева, М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов	26
ИНТЕГРИРОВАННЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК ЧЕЛОВЕКА РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ А.Р. Дягель	29
ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ <i>IN SITU</i> Е.А. Здерева, И.А. Цыденова, М.М. Цыганов	32
ПРЕДИКТИВНАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ И АБЕРРАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ДНК ГЕНОВ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ М.К. Ибрагимова, Е.А. Здерева, М.М. Цыганов	35
КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ А.Д. Казакова, М.А. Ракина, И.В. Ларионова	38
РОЛЬ β-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В СТРЕССОРНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ СЕРДЦА У КРЫС С ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННЫМ МЕТАБИОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ Б.К. Курбатов, А.П. Никифоров	41
К ВОПРОСУ ПРИМЕНЕНИЯ ЧАТБОТА В РЕАБИЛИТАЦИИ ПОСТИНСУЛЬТНЫХ ПАЦИЕНТОВ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ Д.Г. Назметдинова¹, О.В. Терехина	44
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОИСКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ПРИ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ФАЙЛОВ ГЕНОМНЫХ КООРДИНАТ С.Г. Ободзинская, С.Н. Государкина, А.А. Зарубин	47
ОЦЕНКА ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА КЛЕТКАМИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ И.А. Осихов, О.В. Воронкова	50
ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИН ГИДРОХЛОРИДА В МЕДИЦИНЕ О.С. Очиров, М.Н. Григорьева, В.О. Окладникова	53

ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСКРИПТОМА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МОНОЦИТОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Е.А. Простакишина, П.С. Ямщиков, А.А. Фролова	56
АНАЛИЗ ГЕННОГО ПРОФИЛЯ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ КИШЕЧНИКА И МАКРОФАГОВ, ВЫРАЩЕННЫХ В КО-КУЛЬТУРЕ, В ОТВЕТ НА ХИМИОТЕРАПИЮ <i>IN VITRO</i> М.А. Ракина, Е.О. Казакова, И.В. Ларионова	59
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИОННОГО ПРОФИЛЯ ФОСФАТАЗ ДВОЙНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ (DUSP) В МОНОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ К.А. Раченков, П.С. Ямщиков, М.С. Дорофеева	62
СЕКРЕТИРУЕМЫЕ БИОМАРКЕРЫ МАКРОФАГОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ РАКА Т.С. Сударских, М.А. Ракина, Е.Г. Шаповалова	66
СИСТЕМЫ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА А.В. Тарачев, Д.А. Федоришин	69
РОЛЬ КАЛЬЦИЯ В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ ОТВЕТОВ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ В МОДЕЛЯХ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЪЕМА КЛЕТОК Э.В. Тотумачева, А.В. Кирева, В.С. Гусакова	72
ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ СКАФФОЛДОВ НИКЕЛИДА ТИТАНА КУКУРБИТ[6]УРИЛОМ НА ГЕМОЛИТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ Д.А. Федоришин, А.Э. Ухов	75
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЖЕЛЁЗ ГАРДЕРА ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ ТРЕКОВЫХ МЕМБРАН ИЗ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТА В ПЕРЕДНЮЮ КАМЕРУ ГЛАЗА Е.О. Филиппова, А.Д. Журавлева	78
MORPHOLOGICAL CHANGES IN HARDERIAN GLANDS AFTER THE IMPLANTATION OF POLYCAPROLACTONE FILMS INTO THE CORNEA Е.О. Filippova, А.Д. Zhuravleva	81
ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ПЛАЗМЕННЫХ СТРУЙ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК А.А. Фролова, В.О. Нехорошев	84
МЕЖСАЙТОВАЯ ЭКСПРЕССИОННАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА И.А. Цыденова, В.А. Маркович, М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова	87

УДК 615.4

**IN VIVO ANTIOXIDANT EFFECTS OF BETULIN IN STREPTOZOTOCIN-NICOTINAMIDE
INDUCED DIABETIC RATS**

F.O. Adepoju, I.F. Gette, I.G. Danilova

Scientific supervisor: Prof., Dr. E.G. Kovaleva

Ural Federal University, named after the first president of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, Mira str., 19,
620002E-mail: bese010@gmail.com**АНТИОКСИДАНТНЫЕ ЭФФЕКТЫ БЕТУЛИНА IN VIVO У КРЫС С ДИАБЕТОМ,
ИНДУЦИРОВАННЫМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ-НИКОТИНАМИДОМ**

Ф.О. Адеподжу, И.Ф. Гетте, И.Г. Данилова

Научный руководитель: профессор, д.т.н. Е.Г. Ковалева

Уральский Федеральный Университет, имени первого Президента России Б.Н. Ельцина

Россия, г. Екатеринбург, Ул. Мира 19, 620002

E-mail: bese010@gmail.com

***Аннотация.** В этом исследовании мы рассмотрели антиоксидантную активность бетулина при диабете, индуцированном стрептозотоцин-никотинимидом. Результат исследования показал, что бетулин противодействует окислительному стрессу за счет снижения потребности в потреблении антиоксиданта глутатиона и активации антиоксидантных ферментов.*

Introduction. Oxidative stress has been reported to play an important role in the development of vascular complications of diabetes, especially type 2 diabetes (Pham-Huy, 2008). Elevated levels of ROS in diabetes can result in the dysfunction of the antioxidant defense system causing a decrease or increase in the production of antioxidant enzymes. What's more, changes in the levels of these antioxidant enzymes increase tissue sensitivity to oxidative stress, which can then lead to diabetic complications. The purpose of this study was to investigate the therapeutic effect of betulin on streptozotocin (STZ) nicotinamide-induced diabetes by measuring the biochemical and oxidative stress indexes [1-4].

Research methods. In this study, 42 female Wistar rats were grouped into seven (n= 6) including both intact and diabetic control. Diabetes was induced by administration of nicotinamide (110 mg/kg b. wt.) 15 minutes prior to streptozotocin (STZ) injection (65 mg/kg b. wt.) intraperitoneally.

Groupings: group 1: control, group 2: control and water, group 3: control + betulin (50 mg/kg), group 4: diabetic control, group 5: diabetic rats + water, group 6: diabetic rats + betulin (20 mg/kg), group 7: diabetic rats + betulin (50mg/kg). Then serum and erythrocyte levels of FBG, total protein, creatinine, and antioxidant enzymes were evaluated.

Results. The formation of type 2 diabetes mellitus led to increased plasma glucose, lowered creatinine and total protein (Table 1) and depletion of the antioxidant enzymes that is accompanied by a decrease in glutathione and an increase in superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA) as shown

in Table 2 and 3. However, administration of betulin at a dose of 20 and 50 mg/kg b. wt. improved activity of antioxidant enzymes in both blood plasma and erythrocyte hemolysate.

Table 1

Effect of betulin on biochemical analysis of both intact and diabetic groups of rats

Parameter	1 Intact	2 Control+water	3 Control+betulin (50 mg/kg)	4 T2DM	5 T2DM + water	6 T2DM + betulin 20 mg / kg	7 T2DM + betulin 50 mg / kg
Glucose, mmol / L	5.9±0.3	7.7±0.3 *	8.6±0.1 *	11.1±0.5 *, 2	10.3±0.4 2	6.3±0.6 5	8.2±0.6 5
Total protein, g / L	70.5±1.3	67.3±2.2	67.6±1.3	68.5±2.0	64.3±2.1	62.1±1.6	68.0±1.5 6
Creatinine, μmol / L	62.3±1.5	60.2±1.7	64.3±1.6	48.6±3.1 *, 2	67.7±0.7 2	68.0±3.3 2	64.3±1.9

* - the difference with the parameter of the intact group is significant at P<0.05;

2, 4, 5, 6 – the difference with the parameter of group 2, 4, 5 or 6 is significant at P<0.05.

Table 2

Indicators of FRO-AOD in groups of rats 1-4

Parameter	1 Intact	2 Control+water	3 Control+betulin (50 mg/kg)	4 T2DM
Glutathione in blood plasma, μmol / L	20.5±5.3	88.2±8.4 *	47.2±3.4 *, 2	15.1±2.7 2
Glutathione in erythrocyte hemolysate, μmol / g Hb	8.93±0.35	7.82±0.46	10.46±0.54 2	6.81±0.26 *, 2
MDA in plasma, μmol / L	3.78±0.58	3.75±0.38	6.75±0.31 *, 2	7.25±0.61 *, 2
MDA in erythrocyte hemolysate, nmol / g Hb	60.3±1.9	55.0±3.0	120.5±9.0 *, 2	67.4±2.6 2
SOD in erythrocyte hemolysate, units / min·g Hb	112.5±5.0	132.4±3.5 *	130.8±6.6	200.9±9.9 *, 2
Catalase in erythrocyte hemolysate, mmol / min·g Hb	50.2±2.0	48.5±2.8	37.0±2.6 *, 2	64.8±2.9 *, 2

* - the difference with the parameter of the intact group is significant at P<0.05;

2 – the difference with the parameter of group 2 is significant at P<0.05.

Table 3

Indicators of FRO-AOD in groups of rats 2,5-7

Parameter	2 Control- water	5 T2DM + water	6 T2DM + betulin 20 mg / kg	7 T2DM + betulin 50 mg / kg
Glutathione in blood plasma, $\mu\text{mol} / \text{L}$	88.2 \pm 8.4	30.9 \pm 4.8 ₂	77.7 \pm 7.9 ₅	46.1 \pm 5.3 _{2,6}
Glutathione in erythrocyte hemolysate, $\mu\text{mol} / \text{g Hb}$	7.82 \pm 0.46	6.26 \pm 0.48	6.20 \pm 0.47 ₂	6.42 \pm 1.16
MDA in plasma, $\mu\text{mol} / \text{L}$	3.75 \pm 0.38	6.27 \pm 0.25 ₂	5.73 \pm 0.43 ₂	4.46 \pm 0.19 _{5,6}
MDA in erythrocyte hemolysate, $\text{nmol} / \text{g Hb}$	55.0 \pm 3.0	78.3 \pm 5.7 ₂	66.7 \pm 2.3 ₂	65.9 \pm 7.7
SOD in erythrocyte hemolysate, units / min·g Hb	132.4 \pm 3.5	132.8 \pm 8.7	132.2 \pm 4.6	110.9 \pm 13.7
Catalase in erythrocyte hemolysate, $\text{mmol} / \text{min}\cdot\text{g Hb}$	48.5 \pm 2.8	48.9 \pm 1.9	43.3 \pm 1.9	45.3 \pm 1.2

^{2,5,6} – the difference with the parameter of group 2, 5 or 6 is significant at $P < 0.05$.

Conclusion. The results of this study showed that the administration of betulin to diabetic rats has an antioxidant effect and the capacity to modulate oxidative stress. In addition, a dose of betulin at 50 mg/kg b. wt. normalizes the content of malondialdehyde in the blood.

REFERENCES

1. Pham-Huy, L.A., He H., Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health // IJBS. – 2008. – No. 4(2). – P. 89–96.
2. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Biochem. – 1971. – V. 44, № 1. – P. 276-287
3. Fridovich I. (1975). Annu Rev. Biochem. (Snell, E. E., Boyer, P. D., Meister, A. & Richardson, C. C., eds.). Annual Reviews Inc., Palo Alto, CA., Vol. 44, pp. 147–159.
4. Mills G.C. (1959). The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. I. Biol. Chem. V. 231, № 5, pp. 502-506.

УДК 57.053

**POTENTIAL PROTECTIVE EFFECT OF CHLORELLA VULGARIS AGAINST ETHANOL-
INDUCED OXIDATIVE STRESS IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Q.N. Okechukwu, O.N. Kanwugu, E.G. Kovaleva

Scientific Supervisor: Prof. Dr. E.G. Kovaleva

Ural Federal University, Russia, Yekaterinburg, Mira str., 19, 620002

E-mail: queencyokechukwu@gmail.com

**ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ CHLORELLA VULGARIS ПРОТИВ
ИНДУЦИРОВАННОГО ЭТАНОЛОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У SACCHAROMYCES
CEREVISIAE**

К.Н. Окечукву, О.Н. Канвугу, Е.Г. Ковалева

Научный руководитель: профессор. Е. Г. Ковалева

Уральский федеральный университет,

Россия, Екатеринбург, ул. Мира, 19, 620002

E-mail: queencyokechukwu@gmail.com

***Аннотация.** В этом исследовании мы провели эксперименты по выращиванию *in vitro*, чтобы изучить защитный эффект порошка *Chlorella Vulgaris* на рост пивных дрожжей в условиях этанольного стресса. Дрожжи выращивали в среде, замещенной порошком *Chlorella vulgaris* (0,1 и 1% масс./об.), и вызывали стресс путем добавления этанола (до конечной концентрации 5%) через 5 часов. Рост и жизнеспособность клеток контролировали в течение 5 дней, анализируя OD600, плотность клеток, продукцию АТФ и жизнеспособность клеток. Культуры дрожжей, обработанные порошком *Chlorella vulgaris*, показали улучшенную выработку АТФ и жизнеспособность клеток по сравнению с отрицательными (дрожжевые с этанолом) и положительными (только дрожжевые) контрольными группами. Это показывает, что сухой порошок *Chlorella vulgaris* может эффективно снижать токсичность стресса, вызванного этанолом.*

Introduction. Ethanol is known to inhibit the growth of yeasts by targeting their membrane lipid bilayer, hydrophobic and hydrophilic proteins, and the endoplasmic reticulum, thereby altering metabolism and causing damages to the mitochondrial DNA, as well as inactivation of some enzymes, such as hexokinase and dehydrogenase [1,2]. Marine microalgae have shown abilities to offset the biochemical disparities induced by various compounds associated with free radicals [3]. Of particular interest is the single-cell green microalga *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) which can tolerate several heavy metals and metalloids. It contains bioactive compounds that can scavenge free radicals and could serve not just as a nutrient to the yeast cells but also as a detoxicant to prevent ethanol-induced stress. Hence this present study focuses on the possibility of using *Chlorella vulgaris* powder as a potential source to reduce ethanol oxidative stress in yeast (*S. cerevisiae*) culture induced with ethanol.

Materials and methods. 1272 American Ale II brewer's yeast strain were inoculated at a final density of 10^6 cells/ml in a 100ml Sabouraud broth medium mixed with 0.1 or 1%w/v concentrations of chlorella powder at a

temperature of 28 °C. Pure ethanol (5% v/v) was added after 6 hrs. of yeast inoculation and the culture was monitored for 5 days. Every 24hrs yeast growth was monitored by measuring the optical density of the culture at 600 nm (OD_{600nm}) and cell viability and vitality were assessed via cellular ATP content based on the luciferin reaction, and enzymes activity based on monosodium salt (WST-8) [4,5].

Results and discussion. Fig 1, shows the growth of *S. cerevisiae* inoculated within the presence of 5 % ethanol. After 5 days of storage, the densities showed that the chlorella powder has positive effects on maintaining the survival and growth of the yeast cells with the sample treated with 1 % chlorella powder having the highest cell density. Figs 2 and 3 show the results to highlight the protective effects of Chlorella powder on the survival of yeast cells exposed to ethanol with maximum cell viability for 0.1 and 1 % chlorella powder respectively showing 628 and 800 % on the 3rd day for WST-8 assay and 249 and 721% on the 2nd day for ATP assay. In the conditions used in the present study, chlorella vulgaris powder induced significant changes in yeast growth and physiological activity. Statistical analysis indicates significance between the negative control and the treated samples when compared to the normal control. As we have found, the different chlorella powder concentrations greatly extend the mean chronological life span (CLS) of the yeast cultured under ethanolic conditions.

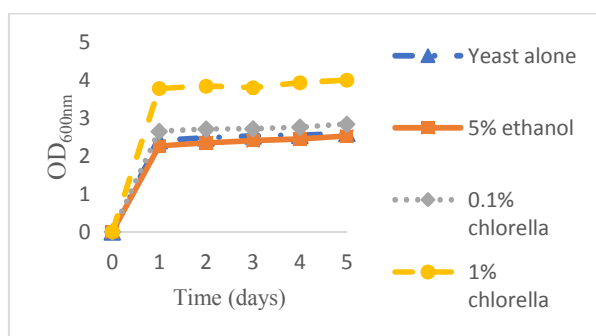


Fig 1: Yeast cell density (OD_{600nm})

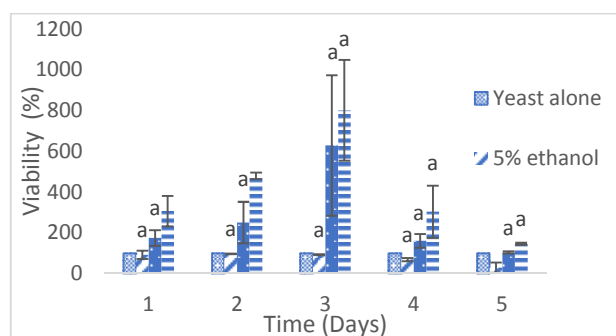


Fig 2: Cell viability determined using Cell Counting Kit-8

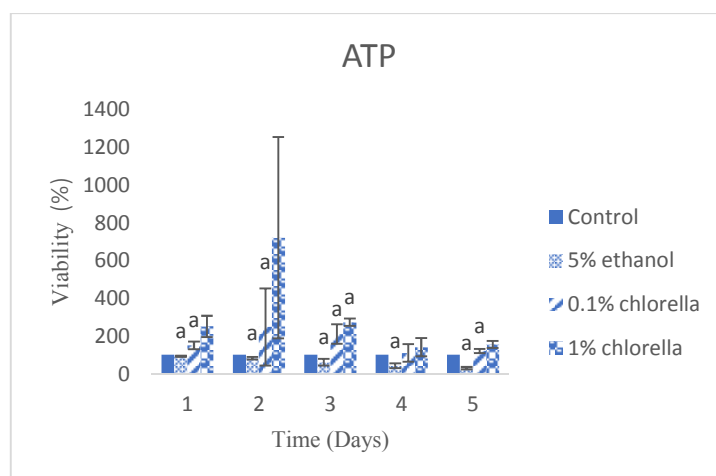


Fig 3. ATP content determined using BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay

Although ethanol is a final product of anaerobic fermentation of sugars by yeast, it is toxic to yeast cells and induces stress responses such as the expression of heat shock proteins and the accumulation of trehalose inhibiting cell division, metabolic activity, and decrease cell viability [6]. They do so by causing considerable damage to the cell morphology, as well as disrupting the composition, structure, and function of the cell membrane leading to a change in membrane structure and permeability resulting subsequently into the leakage of essential cofactors and coenzymes [1].

Conclusion. From the cell viability and vitality assays, it could be inferred that ethanolic stress caused significant death in yeast cells. However, the addition of *Chlorella vulgaris* protected the yeast cells from ethanol stress.

We acknowledge the support of the Russian Science Foundation (RSF) Grant No. 20-66-47017

REFERENCES

1. You, K.M., Rosenfield, C.L., Knipple, D.C. Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2003. – V. 69(30). – P. 1499-1503.
2. Stanley, D., Bandara, A., Fraser S., Chambers, P.J., Stanley, G.A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Applied Microbiology*. – 2010. – V. 109(1). – P. 13-24.
3. Vijayavel, K., Anbuselvam, C., Balasubramanian, M. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella Vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats // *Mol. & Cellular Biochemistry*. – 2007. – V. 303. – P. 39-44.
4. Kwolek-Mirek, M., Zadrąg-Tecza, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells // *FEMS Yeast Res.* – 2014. – V. 14. – P. 1068-1079.
5. Tsukatani, T., Higuchi, T., Suenaga, H., Akao, T., Ishiyama, M., Ezoe, T., Matsumoto, K. Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances // *Analytical Biochemistry*. – 2009. V. 393. – P. 117–125.
6. Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., Blondin, B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* // *FEBS Letters*. – 2001. – V. 498. – P. 98-103.

УДК 577.353.3

**ЭПИТЕЛИЙ-ЗАВИСИМЫЕ СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ГЛАДКИХ МЫШЦ
ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ**Ю.Г. Бирулина, Е.Е. Буйко, М.О. ВольхинаНаучный руководитель: доцент, к.б.н. Ю.Г. Бирулина
Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050E-mail: birulina.jg@ssmu.ru**EPITHELIUM-DEPENDENT AIRWAY SMOOTH MUSCLE CONTRACTIONS IN METABOLIC
SYNDROME**Yu.G. Birulina, E.E. Buyko, M.O. VolkhinaScientific Supervisor: Assoc. Prof., Cand.Sci. Yu.G. Birulina
Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow Trakt str., 2, 634050E-mail: birulina.jg@ssmu.ru

Abstract. *The effect of the epithelium on the contractile responses of isolated airway smooth muscle segments was studied in rats with metabolic syndrome (MS). MS was induced by a high-fat, high-carbohydrate diet. An increase in the cholinergic receptor activator carbacholin bronchoconstrictive action and a decrease in the β_2 -adrenergic receptor agonist salbutamol dilatation effect were shown in experimental MS conditions. The observed effects of agonists are epithelium-dependent.*

Введение. Прогрессивное увеличение распространенности метаболического синдрома (МС) в популяции определяет актуальность исследований, направленных на изучение его значимости в развитии бронхолегочной дисфункции [1]. В ряде исследований была обнаружена взаимосвязь между отдельными компонентами МС (абдоминальное ожирение, гиперинсулинемия, гипергликемия) и нарушениями функции внешнего дыхания [2, 3]. Отмечается, что ожирение и гиперинсулинемия являются факторами, способствующими развитию гиперреактивности бронхов и нарушению эпителиально-гладкомышечных взаимодействий в стенке воздухоносных путей. В свою очередь, экспериментальные диет-индуцированные модели МС являются доступным способом исследования влияния его компонентов на различные ткани и органы на самых ранних этапах развития патологического процесса. В последние годы всё большее распространение приобретает комбинированная высокожировая и высокоуглеводная диета, поскольку она максимально приближена к питанию современного человека и считается корректной для воспроизведения патогенетических факторов и феноменологии МС [4]. В связи с этим, целью исследования являлось изучение сократительных реакций гладкомышечных сегментов воздухоносных путей при экспериментальном МС.

Экспериментальная часть. Диет-индуцированная модель МС была воспроизведена на крысах Wistar (33 самца, средняя масса $280,5 \pm 36,1$ г, возраст на начало исследования 6 недель). Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом СибГМУ (заключение №8201 от 27.03.2020 г.). Животные были распределены на контрольную (n=15) и экспериментальную (n=18) группы и

содержались в стандартных условиях вивария. Крысы контрольной группы получали стандартный корм («Дельта Фидс», Биопро, РФ, общая калорийность 300 ккал/100 г) со свободным доступом к пище и воде. Крысы экспериментальной группы в течение 12 недель находились на высокожировой и высокоуглеводной диете, содержащей стандартный корм (66%) с добавлением животного жира (17%), фруктозы (17%), холестерина (0,25%) с заменой питьевой воды на 20% раствор фруктозы (общая калорийность 440 ккал/100 г). В начале и в конце исследования у животных измеряли массу тела и артериальное давление (АД) (Систола, Нейроботикс, Россия). Животных подвергали эвтаназии CO₂-асфиксией через 12 недель после начала эксперимента. Для оценки биохимических параметров кровь отбирали интракардиально в вакуумные пробирки с активатором свертывания. Сыворотку крови получали путем центрифугирования цельной крови (2000 г, 10 мин). В сыворотке крови определяли концентрацию глюкозы, триацилглицеролов (ТАГ) и холестерина (ХС) ферментативными методами (наборы Chronolab, Испания). Сократительные реакции гладкомышечных сегментов воздухоносных путей (до 2 порядка) крыс оценивали механографическим методом (Myobath II, WPI, Германия). Гладкомышечные препараты инкубировали в аэрируемых камерах, заполненных раствором Кребса, термостатируемых при 37°C, pH 7,35–7,40. Изучали влияние карбахолина (0,1–100 мкМ), салбутамола (0,1–100 мкМ) (все Sigma-Aldrich). Статистическую обработку данных проводили в программе SPSS Statistics 23. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения (M±SD). Анализ различий между выборками выполняли при помощи t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

Результаты. Высокожировая и высокоуглеводная диета приводила к увеличению массы тела, систолического и диастолического АД, способствовала развитию гипергликемии, увеличению концентрации ТАГ в сыворотке крови (таблица 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что кормление крыс высокожировым и высокоуглеводным рационом способствует формированию основных признаков МС.

Таблица 1

Изменение физиологических и биохимических показателей у крыс при МС

Параметр	Группа	
	Контрольная	Экспериментальная
Масса тела, г	433,32±39,4	489,1±47,9*
Систолическое АД, мм рт. ст.	130,4±9,5	145,1±8,7*
Диастолическое АД, мм рт. ст.	86,5±9,3	101,4±12,2*
Глюкоза натощак, ммоль/л	4,7±0,5	6,6±0,4*
ХС, ммоль/л	1,7±0,2	2,3±0,3
ТАГ, ммоль/л	0,7±0,2	1,7±0,5*
Удельная масса жировой ткани, г	2,2±0,2	4,3±0,6*

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

В результате исследования сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей было установлено, что в ответ на действие агониста холинорецепторов карбахолина происходило дозозависимое сокращение сегментов бронхов крыс контрольной и экспериментальной групп (рис. 1, а). При этом амплитуда сократительных ответов интактных сегментов воздухоносных путей у животных опытной группы была выше, чем в контрольной группе. Активация β₂-адренорецепторов салбутамолом на фоне действия карбахолина (1 мкМ) вызывала расслабление гладкомышечных сегментов воздухоносных путей крыс контрольной и опытной групп (рис. 1, б). Интактные гладкомышечные

сегменты крыс опытной группы отвечали на воздействие сальбутамола слабым снижением механического напряжения по сравнению с контрольной группой.

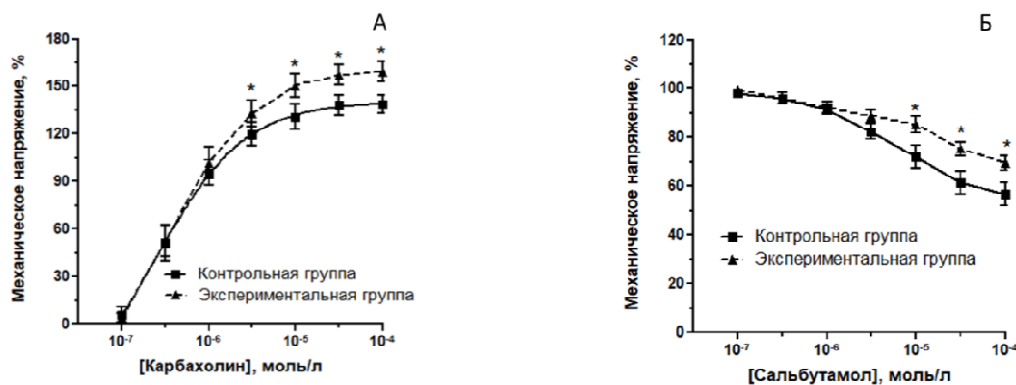


Рис. 1. Влияние карбахолина (А) и сальбутамола (Б) на механическое напряжение гладких мышц воздухоносных путей: * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Заключение. Эпителий играет важную роль в регуляции сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей, выделяя различные констрикторные и релаксирующие факторы [5, 6]. Установлено, что карбахол усиливает сокращение гладких мышц воздухоносных путей, вероятно, за счет повышенной экспрессии М-холинорецепторов и мобилизации кальция из цитозольных запасов [2]. Снижение релаксирующего эффекта сальбутамола может быть обусловлено десенсибилизацией β_2 -адренорецепторов при МС [3]. В результате проведенных исследований показано, что при МС, индуцированном высокожировой и высокоуглеводной диетой, в стенке воздухоносных путей развиваются функциональные изменения, которые могут являться причиной повышенной реактивности дыхательных путей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (МК-3302.2022.1.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mafort T.T., et al. Obesity: systemic and pulmonary complications, biochemical abnormalities, and impairment of lung function // Multidiscip. Respir. Med. – 2016. – Vol. 11. – P. 28.
2. Nie Z., et al. Hyperinsulinemia potentiates airway responsiveness to parasympathetic nerve stimulation in obese rats // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2014. – Vol. 51. – P. 251–261.
3. Pradeepan S., et al. Obesity in asthma: approaches to treatment // Curr. Allergy Asthma Rep. – 2013. – Vol. 13(5). – P. 434–442.
4. Kwitek A.E. Rat models of metabolic syndrome // Methods Mol. Biol. – 2019. – Vol. 2018. – P. 269–285.
5. Дьякова Е.Ю., и др. Эпителиально-гладкомышечные взаимодействия в стенке воздухоносных путей в норме и при формировании гиперреактивности // Росс. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. – 2016. – Т. 102, № 10. – С. 1206–1215.
6. O’Sullivan M.J. et al. Airway Epithelial Cells Drive Airway Smooth Muscle Cell Phenotype Switching to the Proliferative and Pro-inflammatory Phenotype // Frontiers in Physiology. – 2021. – Vol. 12. – P. 1–12.

УДК 577.29

**ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МУТАНТНЫХ ФОРМЫ ГЛИЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА,
СВЯЗАННЫХ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

Е.С. Виноградова

Научный руководитель: к.б.н. Е.Ю. Никонова
Институт белка Российской академия наук,
Россия, г. Пущино, ул. Институтская, 4, 142290
E-mail: es.vinogr@gmail.com

**STUDYING PROPERTIES OF MUTANT FORMS OF HUMAN GLYCYL-tRNA SYNTHETASE
ASSOCIATED WITH NEURODEGENERATIVE DISEASES**

E. S. Vinogradova

Scientific Supervisor: Dr. E. Yu. Nikonova
Institute of protein research, Russia, Pushchino, st. Institutskaya, 4, 142290
E-mail: es.vinogr@gmail.com

Abstract. *Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are the main enzymes of protein biosynthesis. Human glycyl-tRNA synthetase, in addition to the main function of amino acid transfer to the corresponding tRNA molecules, is also involved in the initiation of IRES I translation. All members of the enterovirus genus have this type of IRES. It is also known that the presence of point mutations in aaRS leads to the occurrence of diseases in which peripheral nerves are affected. One such disorder of the nervous system is the incurable neurodegenerative disorder Charcot-Marie-Tooth (CMT). The most studied enzyme whose mutations cause CMT is glycyl-tRNA synthetase (GlyRS). In this work, we tested the ability of various mutant forms of glycyl-tRNA synthetase associated with Charcot-Marie-Tooth syndrome to form a stable complex with IRES I. It turned out that neither catalytic activity nor the ability to form a dimer are necessary for the interaction of GlyRS with IRES.*

Введение. В 2003 году впервые появилось сообщение о связи тяжелого нейродегенеративного заболевания болезнь Шарко-Мари-Тута с миссенс-мутациями в гене глицил-тРНК-синтетазы [1]. Болезнь Шарко-Мари-Тута – самая распространенная наследственная моторно-сенсорная нейропатия у человека. Поскольку данная болезнь связана с точечными мутациями в гене GlyRS, патологические варианты глицил-тРНК синтетазы хорошо биохимически охарактеризованы.

В GlyRS на сегодняшний момент описано более 20 мутаций, связанных с различными нейродегенеративными заболеваниями. L129P и G240R – наиболее часто встречаемый вариант мутаций. Эти аминокислотные остатки располагаются в месте контактов двух молекул GlyRS, образующих димер. Из литературы известно, что GlyRS L129P каталитически неактивен и неспособен образовывать димер. Наличие в белке одиночной мутации в 240 положении так же приводит к потере способности образовывать димер. Мы решили проверить, способны ли такие мутантные формы GlyRS связывать IRES.

Экспериментальная часть. Генетическая конструкция, кодирующая GlyRS WT, была получена в лаборатории ранее. Замены для получения мутантных форм GlyRS L129P и GlyRS L129P/G240, вводили в эту конструкцию последовательно методом QuikChange (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit).

После того как все замены были внесены с помощью PCR QuikChange, отсутствие нежелательных мутаций проверяли секвенированием.

Гены как дикого типа глицил-тРНК синтетазы, так и мутантных форм были экспрессированы в штамме-суперпродуценте *E. coli* BL21(DE3), котрансформированом плазмидой pLacIRARE [2]. Клеточную культуру выращивали при 37°C с интенсивным перемешиванием (160 об/мин) на богатой среде TB с добавлением селективных антибиотиков: ампицилина и хлорамфеникола, до оптической плотности $D_{590} = 0,8$. Индукцию проводили изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ. После добавления индуктора клетки инкубировали при 20°C в течение 17 ч.

Выделение нативной GlyRS, а также ее мутантных форм GlyRS L129P и GlyRS L129P/G240R, осуществляли по следующей схеме. Клетки штаммов-суперпродуцентов ресуспендировали, затем разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора (время – 15 мин; пульс – 1 сек; пауза – 2 сек). Лизат центрифугировали в течение 30 мин при 14 000 g и 4°C.

Первым раундом очистки белков была аффинная хроматография на смоле Profinity™ IMAC Resin, Ni-charged. Препарат GlyRS WT наносили на колонку с носителем HiTrap Heparin High Performance (5 мл). Препараты мутантных форм глицил-тРНК очищали, используя хроматографию на смоле Q-Sepharose. Финальной стадией очистки являлась гель-фильтрация на HiLoad 16/60 Superdex 200. Использование такой схемы позволяет получить препарат целевого белка с чистотой 98%.

Методы получения мРНК и образование комплексов GlyRS WT, GlyRS L129P и GlyRS L129P/G240R с полученными фрагментами IRES те же, что описанные нами ранее [3].

Результаты. Анализируя полученные результаты мы видим: мутантные формы глицил-тРНК синтетазы образуют агрегаты (рис.1 С- синяя линия; Е- фуксия). Полученные нами данные согласуются с описанными в литературе [4]. По результатам проведенных нами хроматографий мы можем сказать, что GlyRS L129P способна образовывать стабильный комплекс с IRES I (рис.1 D по смещению черного профиля относительно синей линии). Поскольку данная мутантная форма каталитически не активна, и не способна образовывать димер, но образует комплекс с вирусной мРНК, мы можем предположить, что для взаимодействия GlyRS с IRES образование димера не является необходимым.

Мутантная форма GlyRS L129P/G240R не образует комплекс с IRES I (рис. F. нет явного смещения профилей относительно друг друга). Эти результаты были нами так же подтверждены методом SPR. Константы связывания. GlyRS L129P с IRES I всего в два раза слабее (48.5 nM), чем GlyRS WT (92.7 nM).

Заключение. Всестороннее изучение комплексов GlyRS со специфическими фрагментами IRES энтеровирусов, решение и анализ их структур даст ключ к пониманию механизма регуляции кэп-независимой инициации трансляции у этих вирусов. Полученная нами мутантная форма глицил-тРНК синтетазы человека, обладающая большей стабильностью и не потерявшая свойств белка дикого типа, поможет нам приступить к поиску условий кристаллизации ее комплексов с фрагментами вирусной мРНК и последующему анализу РНК-белкового взаимодействия в этих комплексах.

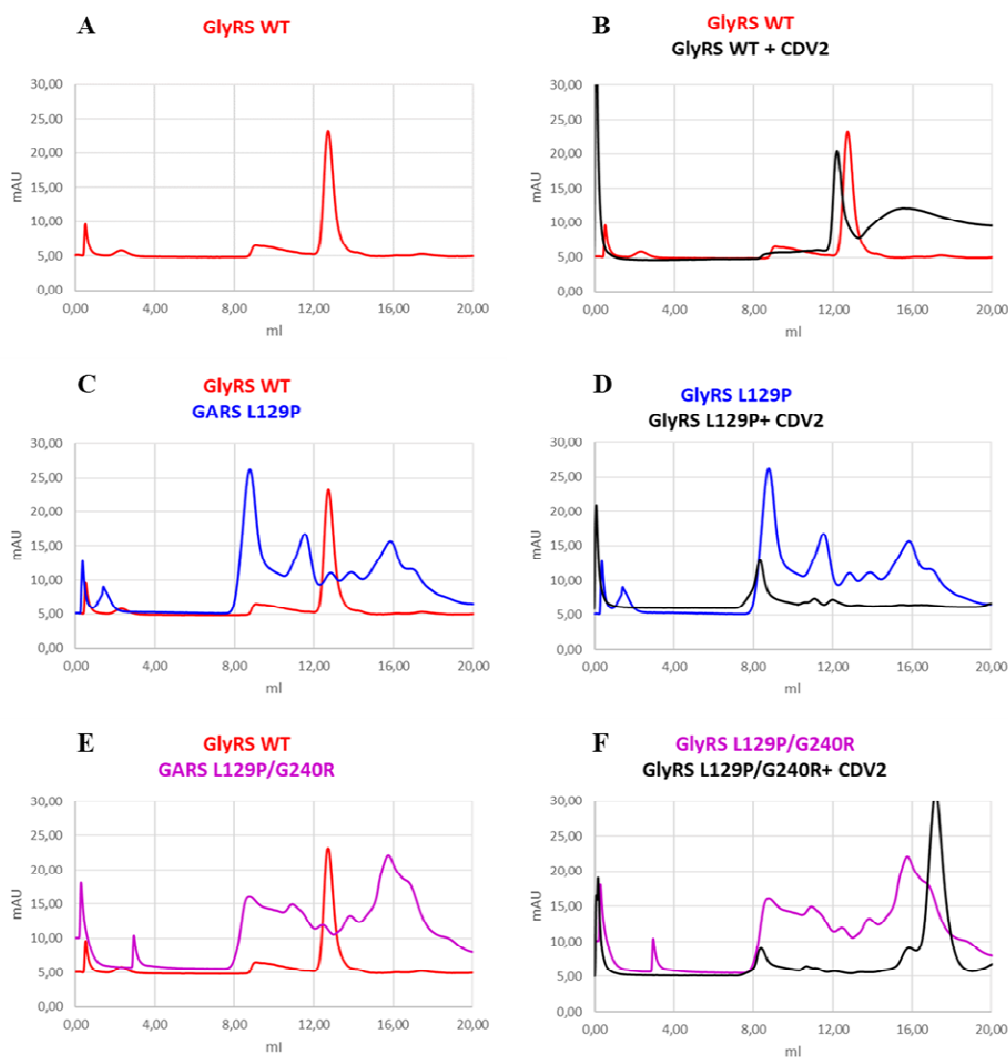


Рис. 1. Наложение профилей элюции хроматографий различных форм GlyRS и их комплексов с фрагментами вирусных мРНК. Красной линией показан профиль элюции GlyRS WT; синий – профиль элюции GlyRS L129P; фуксия- профиль элюции GlyRS L129P/G240R; черная линия комплекс GlyRS с фрагментом вирусного IRES I

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antonellis A., et al. Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V // American Journal of Human Genetics. – 2003. – Vol. 72. – P. 1293–1299.
2. Goldenzweig A., et al. Automated Structure- and Sequence-Based Design of Proteins for High Bacterial Expression and Stability // Molecular Cell. – 2016 – Vol. 63., № 2 – P. 337–346.
3. Никонова Е.Ю., и др. Взаимодействие глицил-тРНК синтетазы с участками IRES, находящимися за пределами в домена // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2017. – Т. 1., № 1. – С. 175–177.
4. Motley W., et al. GARS axonopathy: not every neuron's cup of tRNA // Trends in neurosciences. – 2010. – Vol. 33(2). – P. 59–66.

УДК: 618.19-006.6:575.13

**ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ТРОЙНЫМ
НЕГАТИВНЫМ ФЕНОТИПОМ**

К.А. Гаптулбарова, М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов

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

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный
исследовательский медицинский центр Российской академии наук,

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

E-mail: [Xenia.gaptulbarova@yandex.ru](mailto: Xenia.gaptulbarova@yandex.ru)

GENOME-WIDE ANALYSIS OF A TRIPLE NEGATIVE BREAST TUMORS

K.A. Gaptulbarova, M.K. Ibragimova, M.M. Tsyganov

Scientific Supervisor: Dr.Sci.Biol., Head of Laboratory Oncovirology N.V. Litvyakov

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Russia,

Tomsk, Kooperativny str. 5, 634009

E-mail: [Xenia.gaptulbarova@yandex.ru](mailto: Xenia.gaptulbarova@yandex.ru)

Abstract. *Understanding the genetic mechanisms and identifying biological markers of tumor progression form the individual molecular phenotype of transformed cells, which characterizes the degree of malignancy of the tumor, the ability to metastasize, hormonal sensitivity, the effectiveness of chemotherapy, etc.*

It is known that breast cancer (BC) is a genetically heterogeneous disease with different molecular biological and clinical features. Current knowledge of the genetic heterogeneity of the most aggressive molecular subtype of breast cancer, triple negative (TN), has led to promising discoveries in drug treatment, including the use of DNA damaging agents (platinum drugs and PARP inhibitors) in these tumors, as well as the use of immunotherapy at present.

One way or another, the ability to prescribe optimal drug treatment regimens based on knowledge of the molecular genetic features of this subtype of breast cancer is of the greatest importance, which will ultimately allow achieving high rates of overall and relapse-free survival. Thus, the identification of the molecular genetic phenotype of breast carcinomas is an important prognostic factor of the disease and makes it possible to personalize the treatment of patients.

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) является не только гетерогенным солидным злокачественным новообразованием, но и крайне неоднородным по прогнозу и чувствительности к противоопухолевой терапии заболеванием, что в первую очередь, обусловлено разнообразием множественных молекулярно-генетических изменений, приводящих к его развитию и прогрессии.

На сегодняшний день классически выделяют 4 различных молекулярных подтипа РМЖ: две подгруппы с положительной экспрессией рецепторов эстрогенов и/или прогестерона (ER+/PR+) - люминальные (А и В) (около 70% от всех случаев РМЖ), одна подгруппа с гиперэкспрессией/амплификацией гена HER/2-neu и негативной экспрессией гормональных рецепторов

(HER/2 позитивная подгруппа) и трижды негативный рак молочной железы (ТН РМЖ) с отсутствием экспрессии рецепторов стероидных гормонов и HER2.

В литературе описаны нетипичные факторы, присущие именно данному подтипу РМЖ. Известно, что пациенты с ТН РМЖ более чувствительны к неoadъювантной химиотерапии (НХТ) и достигают хороших результатов лечения в виде полного патологически ответа. При не достижении полного патологического ответа лучший результат лечения на предоперационном сочетается с худшим прогноз в послеоперационном периоде, более низкими показателями безрецидивной и общей выживаемости ($p < 0,0001$), а также большей вероятностью возникновения рецидива заболевания. Данный феномен носит название «парадокс тройного негативного рака молочной железы» [1].

Уже более 10 лет назад Mersin и соавторы обнаружили, что пациенты с ТН РМЖ имеют более высокий риск рецидива, а среднее время рецидива составляет чуть более 1 года, что было короче, чем у других пациентов с РМЖ [2]. На сегодняшний день поиск маркеров для прогнозирования течения заболевания, а также поиск подхода к предотвращению рецидивов и метастазов имеет решающее значение для повышения выживаемости пациентов с ТН РМЖ [3].

Материал и методы. В исследование включены 25 больных с морфологически верифицированным диагнозом ТН РМЖ, средний возраст $47,6 \pm 0,4$ лет. ДНК из биопсийного материала опухоли до лечения выделялась с использованием набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany). Для изучения CNA использована микроматрица высокой плотности CytoScan HD Array (Affymetrix, USA). Для биоинформатического анализа использовалась программа «Chromosome Analysis Suite 4.0».

Результаты. Было установлено, что наибольшее количество амплификаций (более 64,0%) было обнаружено в локусе 1q21.3 при полном отсутствии делеций в данном регионе. Наибольшая частота делеций (более 56,0%) была обнаружена в локусах 3p21.31, 3p21.2, 3p21.1 (с учетом полного отсутствия амплификаций) и 17q11.2. У 44% больных делетирован локус 17p13.1, где находится ген TP53. Обнаружены локусы с одновременным отсутствием сегментных CNA - 13p13, 13p12, 13p11.2, 13p11.1, 14p13, 14p12, 14p11.2, 14p11.1, 14q11.1, 15p13, 15p12, 15p11.2, 15p11.1, 15q11.1, 21p13, 21p12, 21p11.2, 21p11.1, 21q11.1, 22p13, 22p12, 22p11.2, 22p11.1.

На рисунке 1 представлена частота амплификаций и делеций в каждой хромосоме для пациенток, включенных в исследование.

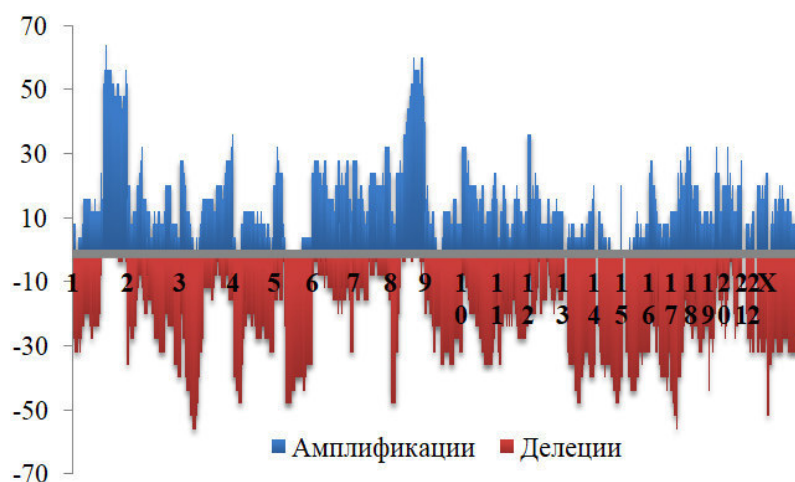


Рис. 1. Частоты делеций и амплификаций в опухоли больных ТН РМЖ

Также изучена ассоциация ответа на НХТ с частотой встречаемости CNA до лечения. Было выделено 2 группы пациенток: группа с объективным ответом (1) – пациентки с частичной и полной регрессией опухоли после лечения (n=15) и группа с отсутствием ответа (2) – пациентки со стабилизацией и прогрессированием после проведения НХТ (n=10). Группы статистически не различались по основным клиничко-морфологическим параметрам.

Для 1 группы пациенток показано, что максимальная частота встречаемости амплификаций (80,0% и более) была также обнаружена в 1q21.3 регионе. При максимальной частоте встречаемости амплификаций в данном регионе показано полное отсутствие делетированных участков, в то время как у больных с отсутствием ответа на НХТ в этом регионе частота амплифицированных участков не превышала 40%. Максимальное количество делеций (66,67 % и более) в 1 группе пациентов отмечена в 17q11.2 локусе с отсутствием амплификаций в данном локусе.

Для 2 группы пациенток было установлено, что наибольшее количество амплификаций (более 60,0 %) на фоне полного отсутствия делетированных участков было обнаружено в локусах 5p15.1 и 8q22.3, в то время как у больных с объективным ответом на НХТ в этом регионе частота амплификаций не превышала 13,3%. Максимальное количество делеций (более 70,0%) на фоне полного отсутствия амплифицированных участков в данной группе пациенток было обнаружено в коротком плече 3 хромосомы в локусах 3p21.31, 3p21.2 и 3p21.1.

В результате сравнения частот встречаемости CNA в данных группах пациенток при помощи двухстороннего критерия Фишера, было показано, что наличие объективного ответа на НХТ наблюдалось при большем количестве амплификаций в 3q23 регионе, в частности, у 30,0% пациенток с частичной и полной регрессией идентифицирована амплификация данного региона при полном отсутствии амплификаций в них в группе пациенток со стабилизацией и прогрессированием (p=0,03). Потенциально данный локус может рассматриваться в качестве предиктивного маркера хорошего ответа на НХТ у больных ТН РМЖ.

Выводы. Получены результаты по оценке генетического ответа ТН РМЖ на НХТ и связи с отдаленным метастазированием. Подобные данные в перспективе могут составить основу для разработки новых маркеров эффективности лечения пациенток с патологией молочной железы с тройным негативным фенотипом.

Работа поддержана грантом РФФ 21-15-00243.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liedtke C., Mazouni C., Hess K.R. [et al.] Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer // Journal of clinical oncology. – 2008. – Vol. 26, № 8. – P. 1275–1281.
2. Mersin H., Yildirim E., Berberoglu U. [et al.] The prognostic importance of triple negative breast carcinoma // The Breast. – 2008. – Vol. 17, № 4. – P. 341–346.
3. Yang C.-Q., Liu J., Zhao S.-Q. [et al.] Recent treatment progress of triple negative breast cancer // Progress in Biophysics and Molecular Biology. – 2020. – Vol. 151. – P. 40–53.

УДК 577.353

**РОЛЬ Na^+/K^+ -АТФАЗЫ В МЕХАНИЗМАХ ОБЪЕМ-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ
СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ
КРЫСЫ**

Е.А. Голованов, В.С. Гусакова

Научный руководитель: доцент, д.м.н. С.В. Гусакова
Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050
E-mail: golovanovbf@yandex.ru

**THE ROLE OF Na^+/K^+ -ATPASE IN THE MECHANISMS OF VOLUME-DEPENDENT
REGULATION OF CONTRACTIBLE ACTIVITY OF RAT PULMONARY ARTERY SMOOTH
MUSCLE CELLS**

E.A. Golovanov, V.S. Gusakova

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., Dr. S.V. Gusakova
Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovsky trakt, 2, 634050
E-mail: golovanovbf@yandex.ru

Abstract. *In this study, we performed the studies of the influence of Na^+/K^+ -ATPase in the regulation of the volume of rat smooth muscle cells. It is assumed that the depressive effect of ouabain on arterial contraction, with prolonged exposure, is due to desensitization to Ca^{2+} ions. Na^+/K^+ -ATPase is involved in RVI (regulatory volume increase), which may explain some fluctuations in cell volume in pathologies due to damage of ion transport. We hypothesize that, under physiological conditions, ouabain-induced depolarization and the subsequent voltage-dependent influx of Ca^{2+} ions play an important role in the potentiation of arterial contraction. Of the various inhibitors of Na^+/K^+ -ATPase, only ouabain blocks its pumping activity and increases intracellular Ca^{2+} through the activation of Src-kinase. In studies on deendothelialized segments of the pulmonary artery of rats, we found that ouabain does not significantly affect the mechanisms of hypoosmotic and hyperosmotic contractions of the vessels of the pulmonary circulation. On the contrary, data were obtained that the contribution of Na^+/K^+ -ATPase to isosmotic contractions is very large, which may indicate an inversion of the normal ratio of Na^+ and K^+ ions relative to the membrane, and its predominant role in restoring cell volume.*

Введение. Легочная гипертензия входит в перечень сопутствующих заболеваний у пациентов с COVID-19, таким образом, весьма важно выявить механизмы ее развития и фармакологические методы лечения [1]. Было показано, что легочная гипертензия сопровождается отеком гладкомышечных клеток легочной артерии наряду с ремоделированием сосудов. В основе развития артериальной легочной гипертензии лежит дисфункция ионных транспортеров, участвующих в регуляции клеточного объема [2, 3]. Na^+/K^+ -АТФаза играет важную роль не только в регуляции тонуса и сократимости сосудов, но и в модуляции периферического сосудистого сопротивления, артериального давления и клеточного объема. Ферментативная активность Na^+/K^+ -АТФазы обеспечивает электрическую возбудимость, а также

движущую силу для многих других трансмембранных переносов [4, 5]. За последнее десятилетие было установлено, что помимо транспорта Na^+ и K^+ через клеточную мембрану, Na^+/K^+ -АТФаза действует как рецептор, передающий гуморальные сигналы внутриклеточно. Предполагается, что убаин-подобные соединения служат эндогенными модуляторами этой трансдукции сигнала. Активация Na^+/K^+ -АТФазы приводит к гиперполяризации мембраны и сосудистой релаксации, в то время как ее ингибирование вызывает деполяризацию мембраны и сокращение сосудов. Мы предполагаем, что в физиологических условиях деполяризация, вызванная ингибитором Na^+/K^+ -АТФазы убаином, и последующий потенциал-зависимый приток ионов Ca^{2+} играют важную роль в потенцировании артериального сокращения. Специфические Src-киназ-зависимые пути при связывании убаина Na^+/K^+ -АТФазы были показаны в нескольких исследованиях гладкомышечных клеток в культуре [6]. Функциональную роль Na^+/K^+ -АТФазы можно рассматривать только в сложной среде на субклеточном, клеточном и многоклеточном уровнях, где Na^+/K^+ -АТФаза структурно и функционально связана с другими мембранными переносчиками, белками цитоскелета и сигнальными молекулами. Это обуславливает важность исследования роли Na^+/K^+ -АТФазы в широком спектре внутриклеточных процессов.

Экспериментальная часть. Объектом исследования служили изолированные деэндоотелизированные гладкомышечные сегменты легочной артерии крыс-самцов линии Wistar. Измерение механического напряжения гладкомышечных клеток (ГМК) проводилось с использованием четырехканальной механографической установки Myobath II. Аппликацию сахарозы в концентрации 120 мМ использовали для моделирования гиперосмотической стрикции гладкомышечных клеток. Изоосмотическую стрикцию вызывали восстановлением ионного состава раствора после 60-минутной инкубации сегментов в гипоосмотической среде, содержащей 40 мМ NaCl. Для исследования сократительной активности сегментов в модели гипоосмотического набухания сегменты помещали в раствор с концентрацией NaCl равной 40 мМ. В экспериментах Na^+/K^+ -АТФазу ингибировали убаином (Ouabain, sigma) в концентрации 100 мкМ. Данная концентрация была выбрана в серии предварительных экспериментов как концентрация, вызывающая статистически значимый эффект на сократительную активность.

Результаты. Все результаты представлены в процентах от контрольного сократительного ответа на гиперкалиевый раствор (эквивалентное замещение 120 мМ NaCl на 15 мМ KCl). При блокировании Na^+/K^+ -АТФазы убаином (100 мкМ, 30 мин) на фоне гиперкалиевого сокращения наблюдалась сократительная реакция, амплитуда которой составила 95,79 (84,45; 106,86) %, от контрольного гиперкалиевого сокращения, что статистически не отличалось от контроля (n=20). Блокада Na^+/K^+ -АТФазы убаином на фоне гиперосмотической и гипоосмотической стрикций, после 30-минутной предобработки сегментов убаином, не вызвала статистически значимых изменений амплитуды и времени сокращений. При добавлении убаина на фоне изоосмотического сокращения, после 30-минутной предобработки сегментов убаином, наблюдалось увеличение амплитуды сокращения, в сравнении с контрольным, до 67,48 (57,0; 88,57) %, от контрольного гиперкалиевого сокращения (n=20).

Заключение. Из полученных данных можно сделать вывод, что Na^+/K^+ -АТФаза не оказывает значимого эффекта на гипер- и гипоосмотическое сокращение сегментов сосудов легочной артерии крыс. Однако, влияние Na^+/K^+ -АТФазы на изоосмотическую стрикцию противоположно: АТФаза вызывает значительное повышение амплитуды сокращения, что может указывать на большую роль фермента в механизмах внутриклеточной регуляции объема при изоосмотических сокращениях ГМК. Убаин

увеличивает внутриклеточный Ca^{2+} за счет активации Src-киназы, тем самым потенцируя сократительный ответ на любые агонисты [7-9]. Теоретически, убаин создает условия для инверсии нормального соотношения токов Na^+ и K^+ и/или превращение Na^+/K^+ -АТФазы в преобразователь сигнала. Возможно, описанный выше эффект может оказывать влияние на электромеханическое сопряжение ГМК в пределах сосудов, внося вклад в развитие и поддержание механического напряжения при артериальной гипертензии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schiffrin, E.L., Flack, J.M., Ito, S., Muntner, P., Webb, R.C. Hypertension and COVID-19 // *American Journal of Hypertension*. – 2020. – Vol. 33. – P. 373-374.
2. Smolyaninova, L.V., Koltsova, S.V., Sidorenko, S.V., Orlov, S.N. Augmented gene expression triggered by Na^+,K^+ -ATPase inhibition: Role of Ca^{2+} -mediated and -independent excitation-transcription coupling // *Cell Calcium*. – 2017. – Vol. 68. – P. 5-13.
3. Akimova, O.A., Hamet, P., Orlov, S.N. $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -independent death of ouabain-treated renal epithelial cells is not mediated by Na^+,K^+ -ATPase internalization and de novo gene expression // *Pflugers Archive*. – 2008. – Vol. 455, №4. – P. 711-719.
4. Clausen, T. Role of Na^+,K^+ -pumps and Transmembrane Na^+,K^+ -distribution in Muscle Function. *Acta Physiology: The FEPS Lecture – Bratislava 2007*. – 2008. – Vol. 192, №3. – P. 339-349.
5. Lingrel, J.B. The Physiological Significance of the Cardiotonic steroid/ouabain-binding Site of the Na^+,K^+ -ATPase // *Annual Review of Physiology*. – 2010. – Vol. 72. – P. 395-412.
6. Liu, J., Tian, J. Haas, M., Shapiro, J.I., Askari, A., Xie, Z. Ouabain interaction with cardiac Na^+/K^+ -ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na^+ and Ca^{2+} concentrations // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275, №36. – P. 27838-27844.
7. Manuta, P., Hamilton, J., Rogowski, A.C., Hamilton, B.P., Hamlyn, J.M. Chronic hypertension induced by ouabain but not digoxin in the rat: Antihypertensive effect of digoxin and digitoxin // *Hypertension Research*. – 2000. – Vol. 23 – P. 77-85.
8. Zulian, A., Linde, C.I., Pulina, M.V., Baryshnikov, S.G., Papparella, I., Hamlyn, J.M., Golovina, V.A. Activation of c-SRC underlies the differential effects of ouabain and digoxin on Ca^{2+} signaling in arterial smooth muscle cells // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2013 – Vol. 304, № 4. – P. 324-333.
9. Климанова Е.А. Убаин и маринобуфагенин: возможные физиологические эффекты на клетки эпителия и эндотелия человека // *Биохимия*. – 2020. – Т. 85., № 4. – С. 587-597.

УДК 618.19-006.6:576.362

**ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ НА СПОСОБНОСТЬ
ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЛИНИЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К ИНДУКЦИИ
ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ДО СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ОБРАЗОВАНИЕМ МАММОСФЕР**

Д.С. Долгашева^{1,2}, М.К. Ибрагимова¹, М.М. Цыганов¹

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

¹Научно-исследовательский институт онкологии Томского научно-исследовательского медицинского центра,
Россия, г. Томск, пер. Кооперативный 5, 634050

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

E-mail: normikus.18.97@gmail.com

**THE EFFECT OF CHEMICAL INHIBITORS OF THE STEMNESS GENES ON THE ABILITY OF
DIFFERENTIATED BREAST CANCER CELL LINES TO INDUCE DEDIFFERENTIATION TO
TUMOR STEM CELLS WITH FORMATION OF MAMMOSPHERES**

D.S. Dolgasheva^{1,2}, M.K. Ibragimova¹, M.M. Tsyganov¹

Scientific Supervisor: Doctor of Biological Sciences N.V. Litvyakov^{1,2}

¹Tomsk Cancer Research Institute, Russia, Tomsk, Kooperativny Street, 5, 634050

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

E-mail: normikus.18.97@gmail.com

Abstract. *In the present study, we studied the ability of differentiated tumor cells to stem plasticity and the formation of mammospheres in the presence of stemness genes inhibitors. We used breast cancer cell lines: BT-549, MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 and T47D. The cells were cultured in complete nutrient media RPMI-1640, IMDM, and DMEM. The genetic landscape of CNA was examined on CytoScan HD Array microarrays, and cellular transcriptome assessment on Clarius S Assay platform. The subpopulation composition of cell cultures was studied by flow cytometry. Negative sorting of differentiated cells was performed on a Sony SH800 device. All cell cultures, except for BT-549, were shown to contain two or more amplifications of stemness genes. MCF-7 and T47D cells were selected for experiments based on the results of subpopulation composition analysis. Wild-type MCF-7 cells were shown to spontaneously form mammospheres without IL6 induction on day 14 of cultivation. Differentiated MCF-7 cells form complete mammospheres on day 14 only in the presence of IL6. The experiment using stemness gene inhibitors was performed on T47D cells. T47D were found to be capable of spontaneous dedifferentiation and mammosphere formation. Chemical inhibitors in combination were shown to effectively block the dedifferentiation of T47D tumor stem cells.*

Введение. В 2013 году Cristine Chaffer с коллегами предположила, что разные опухоли обладают разной способностью к дедифференцировке и этим будет определяться их злокачественный потенциал и способность к метастазированию [1]. Мы также предполагаем, что способность к дедифференцировке у нестволовых опухолевых клеток определяет злокачественность опухоли. Ранее мы показали, что приобретение способности к дедифференцировке является маркером готовности опухоли к

метастазированию. Этот процесс происходит при эктопической экспрессии генов стволовости за счет амплификаций их локусов в разных хромосомах опухолевых клеток. На клиническом материале показано, что наличие двух и более амплификаций разных хромосом в резидуальной опухоли ассоциировано с высокой частотой метастазирования [2]. **Целью настоящей работы** явилось изучение способности дифференцированных опухолевых клеток (ДОК) молочной железы к дедифференцировке до опухолевых стволовых клеток (ОСК) и образованию маммосфер в присутствии ингибиторов генов стволовости.

Экспериментальная часть. Стабильные клеточные линии рака молочной железы (BT-549, MCF-7, SK-BR-3 и T47D) культивировали в полных питательных средах RPMI-1640, IMDM и DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина и антибиотика-антимикотика. Первоначально оценивали СНА-генетический ландшафт исследуемых линий с помощью микроматрицы CytoScan HD Array. Методом проточной цитометрии изучали субпопуляционный состав с использованием моноклональных антител к поверхностным белкам CD44 и CD24. По результатам субпопуляционного анализа были отобраны линии MCF-7 и T47D. С клетками MCF-7 с были проведены эксперименты по индукции дедифференцировки и оценен транскриптом на микроматрицах Clariom S Assay. Далее сравнивали экспрессию 43 генов стволовости в клетках MCF-7 на 3 и 21 сутки культивирования. Эксперимент по ингибированию генов стволовости проводили на линии T47D. Клетки инкубировали с флуоресцентно-меченными антителами к CD44 в FACS-буфере в течение 40 минут в темноте на льду и далее дважды отмывали FACS-буфером. После осуществлялся негативный сортинг клеток, отрицательных по CD44, на сортере Sony SH800. Целевые клетки в концентрации 2000 в 1 мл рассаживали в 12-луночные планшеты. Во все лунки вносили IL-6 (50 нг/мл) и один из ингибиторов – VIBR1532 (ген *TERT*), 10058-F4 (ген *MYC*), FLI-06 (ген *NOTCH1*), в концентрациях, эквивалентных их IC50. В ряд лунок вносили комбинацию IL-6 и трех ингибиторов. Клетки выращивали в течение 21 дня. На 3, 7, 14 и 21 сутки проводили оценку морфологии клеток и подсчет образовавшихся маммосфер, а также транскриптомный анализ для всех групп на 3 сутки и анализ экспрессии 43 генов стволовости.

Результаты. Все клеточные линии, кроме BT-549, содержат две и более амплификации генов стволовости. Основную массу у MCF-7 составляет субпопуляция прогениторных опухолевых клеток (ПОК), ДОК составляют 13% популяции. Для SK-BR-3 и BT-549 основную массу составляют ДОК 2-го порядка. У линии клеток T47D, общее количество ДОК 1 и 2 поколения составляет 29%. Показано, что клетки MCF-7 дикого типа спонтанно образуют маммосферы без индукции IL6 уже на 14 сутки культивирования, но в присутствии IL6 на 14 и 21 сутки наблюдается большее количество крупных маммосфер. ДОК MCF-7 без IL6 не образуют маммосферы на 14 сутки, лишь на 21 день появляются мелкие сфероиды. В присутствии IL6 маммосферы образуются уже на 14 сутки. Маммосферы на 21 сутки инкубации в лунках ДОК+IL6 имеют более крупный размер. Сравнение экспрессии генов стволовости на 3 и 21 сутки роста показало, что первоначально, в группе ДОК+IL6, снижается более чем в 2 раза экспрессия *VIM*, *TERT* и *LNMB2* и повышается экспрессия *KLF4*. На этапе маммосферообразования на 21 сутки в группе ДОК+IL6, усиливается экспрессия *LMNB2*, *SOX4*, *FZD1*, *MYC*, *BMI1*, *KLF5*, *SMAD9*, *SMAD4*, *SMAD2*, *HIF3A* и снижается *DPPA4*, *SNAI2*, *SOX1*, *FLT3*. Снижение экспрессии *SNAI2* свидетельствует об ингибировании эпителиально-мезинхимального перехода (EMT). Экспрессия *MYC* активируется при маммосферообразовании во вторую фазу на 21 сутки. Действие IL6 на клетки дикого типа и ДОК различно. У дикого типа на 3-е сутки IL6 активирует экспрессию *SOX2*,

TERT и ингибирует *PIMI*. *SOX2* запускает деление ОСК, что приводит к формированию маммосфер. В ДОК на 3 сутки под действием IL6 падает экспрессия генов *LMNB2*, *VIM* и *SMAD9*. При снижении экспрессии *VIM* снижается активность ЭМТ и это происходит именно под действием IL6. На 21 сутки IL6 в клетках дикого типа активирует экспрессию *DPPA4*, *SOX1*, *SMO*, *MOB3B*, *LAT* и ингибирует экспрессию *KLF5*, *KLF4*, *MYC*, *LNMB2*, *SMAD2*, *SMAD4*, *BMI1*. В ДОК IL6 на 21 сутки активирует экспрессию *SMAD9*, *SMAD2*, *KLF6*, *BMI1*, *MYC* и ингибирует *FLT3*, *DPPA4*, *SNAI2*. Эксперимент с T47D показал, что данная линия способна к спонтанной дедифференцировке и маммосферообразованию без стимуляции IL6. В группе ДОК сфероиды образуются без IL6 уже на 3 сутки эксперимента, а на 7 сутки полноценные маммосферы. На 21 сутки количество маммосфер в группе с ДОК меньше, чем в контроле, при этом клеточная масса в контрольной группе ДОК больше. Ингибиторы B1BR1532 и 10058-F4 блокируют дедифференцировку ДОК T47D до ОСК, маммосферы не образуются даже на 21 сутки. B1BR1532 и 10058-F4 блокируют активность ОСК в клетках дикого типа. FLI-06 снижает дедифференцировку ДОК до ОСК. На 14 и 21 сутки роста в группе ДОК+FLI-06 обнаружены сфероиды. Маммосфер на 21 сутки в этой группе меньше, чем в группе ДОК без IL6 и группе ДОК+IL6. FLI-06 также снижает активность ОСК в культурах дикого типа и блокирует пролиферативную активность и дедифференцировку до ПОК. Комбинация ингибиторов не купирует пролиферацию ПОК и подавляет активность имеющихся ОСК. Комбинация ингибиторов в ДОК T47D подавляет дедифференцировку до ОСК и ПОК. Показано, что ингибитор B1BR1532 подавляет экспрессию 11 генов стволовости (*MYC*, *FZD9*, *NANOG*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FZD1*, *SMO*, *MOB3B*, *ITGB1*, *BMI1*, *TGFBR1*), из них два амплифицированы у T47D (*MYC* и *FZD9*). При этом активируется экспрессия *KLF6* и *LAT*. Ингибитор 10058-F4 подавляет экспрессию *MYC*, *NANOG*, *FZD9*, *MOB3B*, *TGFBR1* и *PIMI*. Также 10058-F4 повышает активность 11 генов (*SOX2*, *KLF4*, *KLF6*, *KLF1*, *SMAD2*, *SMAD9*, *LIFR*, *LNMB2*, *ZEB1*, *BMP6*, *HIF3A*). FLI-06 снижает в 2 и более раза экспрессию *VIM*, *DPPA4* и *FZD9* и не препятствует дедифференцировке ДОК, этому способствует и повышенная экспрессия других генов стволовости (*SOX2*, *KLF6*, *SOX4*, *INSR*, *HIF3A*, *NOTCH4*, *KLF4*, *ZIC2*, *KLF1*, *LAT*). За счет ингибирования экспрессии *VIM*, *DPPA4* и *FZD9* не происходит только дедифференцировки ДОК до ПОК. Все три ингибитора, по сравнению с группой ДОК+IL6 подавляют, более чем в 2 раза, экспрессию 12 генов стволовости (*NANOG*, *LNMB2*, *LIFR*, *MYC*, *ZIC2*, *KLF6*, *MOB3B*, *TGFBR1*, *FZD9*, *BMI1*, *SMAD4*, *ITGB1*).

Заключение. Таким образом показано, что ингибирование генов стволовости предотвращает дедифференцировку нестволовых опухолевых клеток до прогениторных и стволовых. Химические ингибиторы, в комплексе, показали эффективную блокировку дедифференцировки опухолевых клеток линии T47D. Так ингибирование лишь 3 из 9 амплифицированных в T47D генов стволовости предотвращает дедифференцировку ДОК до стволовых и прогениторных клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-15-00243

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chaffer C. L. et al. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity // *Cell*. – 2013. – V.154. №. 1. – P. 61–74.
2. Litviakov N. V. et al. Somatic-stem transition of tumor cells is a key link in the metastasis // *Annals of Oncology*. – 2018. – V.29. – P. VIII682.

УДК 616.13.002.2-004.6

**ИНТЕГРИРОВАННЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК
АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК ЧЕЛОВЕКА РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ**

А.Р. Дягель

Научный руководитель: А.А. Зарубин

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского НИМЦ,

Россия, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10, 634050

E-mail: nastasiassmu@gmail.com

**INTEGRATIVE ANALYSIS OF SINGLE-CELL RNA-SEQUENCING DATA OF HUMAN
ATHEROSCLEROTIC PLAQUES FROM DIFFERENT LOCATIONS**

A.R. Diagel

Scientific Supervisor: A.A. Zarubin

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMС, Russia, Tomsk, Naberezhnaya r. Ushayki, 10, 634050

E-mail: nastasiassmu@gmail.com

***Abstract.** In the present study, we performed an integrative analysis of single-cell RNA-sequencing data of coronary and carotid atherosclerotic plaques of ten patients. We identified 22 specific cell populations that include 12 clusters of immune cells, 5 clusters of smooth muscle cells, 3 types of endothelial cells, fibroblasts, and neurons. We classified ten patients into three groups according to their most prevalent smooth muscle cell types and found a population which can potentially protect patients from symptomatic forms of atherosclerosis.*

Введение. Атеросклероз сосудов представляет собой хроническое воспалительное заболевание, в ходе которого происходит образование богатой липидами атеросклеротической бляшки (АБ), дальнейшее разрастание ее некротического ядра, и, как следствие, фиброз и кальцификация окружающих тканей. В процесс ремоделирования сосудистой стенки вовлечены множественные клеточные субпопуляции, такие как гладкомышечные клетки (ГМК) с измененным фенотипом, про- и антиатерогенные эндотелиальные и различные типы резидентных иммунных клеток [1].

Изучение патогенеза атеросклероза на уровне отдельных клеток дает возможность более полно охарактеризовать клеточную гетерогенность образцов, идентифицировать новые типы клеток в АБ, предложить интерпретацию их роли в прогрессировании заболевания, а также выявить новые молекулярно-генетические механизмы атеросклероза [2]. На сегодняшний день опубликовано несколько исследований по анализу данных РНК-секвенирования единичных клеток (scRNA-seq) АБ человека. Материалом для работы Wirka R.C. et al. [3] послужили все слои стенки пораженных атеросклерозом коронарных сосудов. Pan H. et al. [4] изучили АБ сонных артерий. Alsaigh T. et al. [5] рассмотрели АБ сонных артерий, а также прилегающие к ним интактные участки сосудов. У некоторых пациентов, описанных в этих работах, атеросклероз клинически имел симптоматическое течение, то есть был осложнен острыми сосудистыми событиями – ишемический инсульт или инфаркт миокарда, а у других – асимптоматическое, без осложнений.

Объединение данных вышеупомянутых исследований посредством интегрирования транскриптомов единичных клеток АБ человека и последующее применение на них современных биоинформатических подходов позволит более полно описать картину клеточной гетерогенности АБ с учетом локализации протекающего процесса.

Целью работы является идентификация ключевых клеточных субпопуляций атеросклеротических бляшек коронарных и сонных артерий человека на основе анализа объединенных данных РНК-секвенирования единичных клеток.

Экспериментальная часть. Материалом для исследования послужили первичные данные РНК-секвенирования АБ, полученные Wirka R.C. et al. (n=4), Pan H. et al. (n=3) и Alsaigh T. et al. (n=3). Для биоинформатического анализа данные были загружены из открытой базы данных SRA (SRP199578, SRP274629, SRP287809) с помощью инструмента SRAtools. Для получения таблиц экспрессии генов в образцах был использован инструмент CellRanger.

Обработка и визуализация данных, анализ дифференциальной экспрессии генов были проведены в программной среде R 4.0.4. с использованием программного пакета Seurat. Для поиска и удаления дублетов – артефактов, полученных в ходе слияния двух клеток, применялся пакет DoubletFinder. Батч-эффект исправлялся при помощи стандартного протокола интеграции данных Seurat. С помощью пакета SingleR проводилась автоматическая аннотация клеточных популяций, которая, в дальнейшем, подвергалась ручной корректировке. Описание клеточных типов происходило в соответствии с размещенной в базах данных (WebGestalt, Uniprot, PanglaoDB) информацией о дифференциально экспрессируемых генах (ДЭГ) кластеров клеток. ДЭГ отбирали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни при уровне значимости $p < 0,05$ с учетом поправки Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения.

Результаты. Интегрированные данные содержали информацию о 81844 клетках, среди которых 18412 соответствовали эксперименту по коронарным артериям, 52164 и 11268 – по сонным. Из дальнейшего анализа были исключены клетки, экспрессирующие менее 250 и более 5000 различных генов, содержащие менее 1000 и более 30000 мРНК и более 7,5% митохондриальных генов. Также были обнаружены и удалены 5013 дублетов. После контроля качества осталось 61824 клетки (8370 клеток коронарных артерий, 39127 и 14327 – сонных), что составило 75,54% от исходных данных.

В ходе кластеризации клеток было обнаружено 22 клеточных популяции. В частности, идентифицировано 12 кластеров иммунных клеток, среди которых 3 субпопуляции CD8⁺ Т-лимфоцитов (28,1%), 4 субпопуляции клеток моноцитарно-макрофагального ряда (17,9%), 2 типа В-лимфоцитов (4,3%), натуральные киллеры (3,2%), плазматические (1,4%) и тучные клетки (1,3%). Также в атеросклеротических бляшках выявлена популяция нейронов (0,5%), фибробластов (4,4%), 3 типа эндотелиальных клеток (14,2%) и 5 кластеров гладкомышечных клеток и их измененных форм (контрактильные ГМК (7,6%), активированные ГМК (4,9%), воспалительные фибромиоциты (8,2%) и 2 подтипа ГМК с остеохондрогенным (ОХ) фенотипом (4,0%).

Соотношение долей клеточных популяций различалось между АБ коронарных и сонных артерий. Три группы пациентов имели похожее распределение частот клеток с ГМК-подобным фенотипом. Первая группа объединяет 3 АБ коронарных артерий, в которых преобладают активированные ГМК (39,3-46,5%), имеющие тенденцию к миграции (*ID4*, *CCN1*). Доминирующая субпопуляция ГМК у

группы пациентов с АБ, локализованными в сонных артериях – воспалительные фибромиоциты (39,3-54,1%), участвующие в организации внеклеточного матрикса (*LUM, BGN, VCAN, FN1, COL1A1*) и поддерживающие воспаление (*TNFRSF11B, CFH, CCL19, CIR*). Третья группа включает АБ коронарной и сонных артерий, в которых контрактивные ГМК (*MYH11, MYL9, TPM2, PLN, TAGLN*) составили от 49,0 до 71,7%.

В сонных артериях четырех пациентов, двое из которых имели асимптоматическое течение заболевания, обнаружена клеточная популяция – ГМК с ОХ фенотипом 1 (5,1-42,8%). Данной популяции практически не наблюдается у трех пациентов с АБ в коронарных сосудах (0-0,2%), а также она полностью отсутствует (0%) в АБ сонной артерии пациента, имеющего симптоматическое течение заболевания. Все остальные клеточные типы присутствуют в АБ пациентов на уровне, большем 1,6%.

Популяция ГМК с ОХ фенотипом 1 может быть больше свойственна для АБ сонных артерий, чем коронарных, а также преобладать у пациентов, имеющих асимптоматическое течение атеросклероза. Предположительно, данная группа клеток выполняет протективную функцию, предотвращая осложненное течение атеросклероза.

Заключение. Анализ интегрированных данных РНК-секвенирования единичных клеток АБ сонных и коронарных артерий позволил разделить пациентов на три группы, согласно соотношению популяций клеток с ГМК-подобным фенотипом. Обнаружена популяция ГМК с ОХ фенотипом 1, которая встречается только в сонных артериях и может иметь защитную роль для клинически осложненного течения атеросклероза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Libby P., Buring J.E., Badimon L., et al. Atherosclerosis // Nature Review Disease Primers. – 2019. – Vol. 5. – № 56. – P. 1-18.
2. Tang, X., Huang, Y., Lei, J. et al. The single-cell sequencing: new developments and medical applications // Cell Biosci. – 2019. – Vol. 9., №. 53.
3. Wirka R.C., Wagh D., Paik D.T., et al. Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis // Nature Medicine. – 2019. – Vol. 25., – № 8. – P. 1280-1289.
4. Pan H., Xue C., Auerbach B.J., Fan J., Bashore AC., Cui J., Yang D.Y., Trignano S.B., Liu W., Shi J., Ihuegbu C.O., Bush E.C., Worley J., Vlahos L., Laise P., Solomon R.A., Connolly E.S., Califano A., Sims P.A., Zhang H., Li M., Reilly M.P. Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human // Circulation. – 2020. – Vol. 142., – № 21. – P. 2060–2075.
5. Alsaigh T., Evans D., Frankel D., Torkamani A. Decoding the transcriptome of atherosclerotic plaque at single-cell resolution // bioRxiv. – 2020. Published online.

УДК: 618.146-006.6:578.827.1

ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ *IN SITU*

Е.А. Здерева, И.А. Цыденова, М.М. Цыганов

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

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр РАН

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

E-mail: zdereva.e@gmail.com

HUMEN PAPILLOMAVIRUS IN CERVICAL CANCER *IN SITU*

E.A. Zdereva, I.A. Tsydenova, M.M. Tsyganov

Scientific Supervisor: PhD, M.K. Ibragimova

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS, Russia, Tomsk, Kooperativny Lane,
5, 634009

E-mail: zdereva.e@gmail.com

Abstract. *Malignant tumors of the reproductive system are the most common in the structure of oncological morbidity in women, among which cervical cancer remains the most common form of neoplasm. The triggering factor for the occurrence of cervical cancer of cases is infection with the human papillomavirus of high carcinogenic risk. The result of timely detection and treatment of cervical cancer in situ is the prevention of the progression of the malignant process. The aim of the work is to identify, type and determine the viral load of HRC HPV in patients diagnosed with cervical cancer in situ. The study included 27 patients with cervical cancer in situ. The material was scrapings of the epithelium of the cervical canal and the outer part of the cervix. Detection and genotyping of HPV DNA is carried out by real-time PCR. As a result of the study, it was found that the infection rate of HRC HPV in the study sample was 63.0%. Genotyping of HPV-positive samples showed that in 76.5% of patients there was a prevalence of HPV genotype 16, in second place were HPV types 33 and 56 (17.7%). The predominance of mono-infection (70.5%) was revealed. When determining the viral load, it was found that in HPV-positive samples, in almost all cases, a clinically significant viral load was determined.*

Введение. Для населения России заболеваемость злокачественными новообразованиями (ЗНО) является острой медицинской и социальной проблемой. Злокачественные опухоли репродуктивной системы являются наиболее частыми в структуре онкологической заболеваемости женщин, среди которых рак шейки матки (РШМ) остается одной из наиболее распространенных форм новообразований, занимая седьмое место в мире среди всех ЗНО, четвертое – среди всех ЗНО женского населения и второе – среди злокачественных новообразований женских репродуктивных органов после рака молочной железы [1]. Рак шейки матки *in situ* это нулевая стадия рака шейки матки, при которой злокачественные изменения локализируются в эпителии шейки матки, не затрагивая базальную мембрану. Известно, что на сегодняшний день рак шейки матки является единственным злокачественным новообразованием, для которого общепризнан этиологический фактор. Этиологическим фактором для возникновения рака шейки матки более чем в 90% случаев является инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ)

высокого канцерогенного риска (ВКР) [2]. Актуальность проблемы раннего выявления и лечения нулевой стадии рака шейки матки обусловлена, с одной стороны, развитием этого заболевания у женщин молодого возраста, а с другой – недостаточной эффективностью существующих методов лечения. Результатом своевременного выявления РШМ *in situ* является предотвращение дальнейшего прогрессирования злокачественного процесса. Таким образом, **целью** работы является выявление, типирование и определение вирусной нагрузки ВПЧ ВКР у пациенток с диагнозом РШМ *in situ*.

Материалы и методы. Всего в исследование было включено 27 пациенток в возрасте от 24 до 79 лет с диагнозом рак шейки матки *in situ*. Диагноз верифицирован гистологически, опухоли были охарактеризованы в соответствии с классификацией FIGO. Материалом для исследования послужили соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки. Выявление и генотипирование ДНК ВПЧ проводили методом PCR Real Time (RotorGene 6000, «Corbett Research», Австралия) с использованием комплектов реагентов фирмы «Amplisens®» (Москва, Россия). Значение вирусной нагрузки рассчитывалось в геномных эквивалентах ДНК ВПЧ/10⁵ клеток.

Результаты. Наличие ВПЧ-положительного рака шейки матки *in situ*, ассоциированного с одним или одновременно с несколькими типами ВПЧ, были обнаружены у 17 пациенток (63,0%) и у 10 больных (37,00%) ВПЧ в опухоли не был выявлен. Стоит отметить, что в одном из ранее проводимых исследований на примере Российской популяции пациенток частота ВПЧ-положительных пациенток с РШМ I-IV стадий составила 86,0% [1]. Согласно результатам предыдущих собственных исследований, частота ВПЧ-положительных пациенток РШМ I-IVa стадий составила уже 72,4%, соответственно, у 27,6% пациенток ВПЧ в опухоли не был выявлен [2]. Таким образом, для больных РШМ *in situ* показана высокая инфицированность вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска.

Генотипирование вирус-положительных образцов показало превалирование ВПЧ 16 типа (76,5% случаев), что согласуется с мировыми литературными данными и полученными ранее результатами (49,0% и 67,8%, соответственно) [1, 2]. На втором месте по частоте встречаемости для пациенток с РШМ *in situ* находятся ВПЧ 33 и 56 генотипов (по 17,7%). Так, согласно литературным данным, в группе больных РШМ I-IVa второе место занимал ВПЧ 31 типа (16,0%) [1]. В то время как в предыдущем собственном исследовании в группе больных РШМ I-IVa второе место занимал ВПЧ 33 типа (22,6%) [2]. Также в настоящей работе для пациенток с РШМ *in situ* в 5,9% случаев детектировали ВПЧ 39, 45, 51, 52 типов (Рис. 1). Таким образом, полученные данные отражают особенности распространения ВПЧ ВКР для исследуемой группы пациенток в Томском регионе.

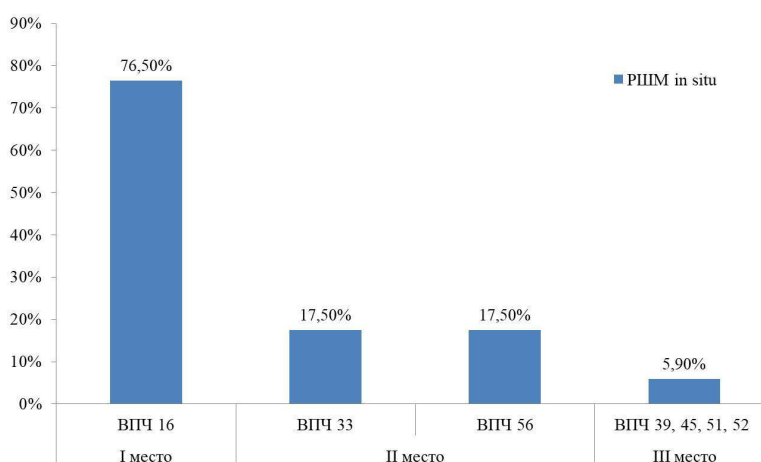


Рис. 1. Распределение частот встречаемости генотипов ВПЧ ВКР групп пациенток с раком шейки матки *in situ*

В результате исследования распространенности моно- и микст-инфицирования было выявлено преобладание моно-инфицирования (70,5%), а частота встречаемости двух и более генотипов вируса одновременно составила 29,5%.

При определении вирусной нагрузки (концентрации ДНК вируса) в исследуемых образцах было показано, что количество пациенток с показателем низкой вирусной нагрузки ($<3 \lg$ ДНК ВПЧ/ 10^5 клеток) в исследуемой группе пациенток составило 29,4%, при этом, показатель высокой (клинически значимой) вирусной нагрузки ($>3 \lg$ ДНК ВПЧ/ 10^5 клеток) составил 70,6%. Согласно собственным предыдущим результатам, в группе пациенток с РШМ I-IVa был выявлен показатель малозначимой вирусной нагрузки равный 22,6%, в то время как показатель клинически значимой вирусной нагрузки составил 77,4% [2]. Таким образом, показана высокая частота клинически значимой вирусной нагрузки для пациенток с РШМ *in situ*.

Заключение. В результате проведения представленного исследования было проведено выявление, типирование и определение вирусной нагрузки вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска у пациенток с диагнозом рак шейки матки *in situ*. Был показан высокий уровень инфицированности ВПЧ ВКР в исследуемой выборке пациенток, а также наличие высокого уровня клинически значимой нагрузки и превалирование ВПЧ 16 генотипа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляева Е.В., Токарская О.А., Баирова Т.А. Особенности распространения папилломавирусной инфекции в различных регионах Российской Федерации (обзор литературы) // Acta Biomedica Scientifica. – 2018. – Т. 3., №. 3. – С. 127–135.
2. Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Чуруксаева О.Н., Коломиец Л.А., Литвяков Н.В. Анализ выживаемости больных ВПЧ-ассоциированным и ВПЧ-негативным раком шейки матки // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9., №. 3–4. – С. 595–599.

УДК 618.19-006.6:575.113

**ПРЕДИКТИВНАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ И АБЕРРАЦИЙ
ЧИСЛА КОПИЙ ДНК ГЕНОВ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

М.К. Ибрагимова, Е.А. Здерева, М.М. Цыганов

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

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр РАН

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

E-mail: zdereva.e@gmail.com

**PREDICTIVE AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF EXPRESSION AND ABERRATIONS
OF THE DNA COPY NUMBER OF CHEMOSENSITIVITY GENES IN PATIENTS WITH BREAST
CANCER**

M.K. Ibragimova, E.A. Zdereva, M.M. Tsyganov

Scientific Supervisor: Dr. N.V. Litviakov

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS, Russia, Tomsk, Kooperativny
Lane, 5, 634009

E-mail: zdereva.e@gmail.com

***Abstract.** Increasingly, many researchers are focusing on the sensitivity in breast tumors (BC) to certain chemotherapy drugs and have personalized their research based on the assessment of this sensitivity. One such personalized approach is to assess the chemotherapy's gene expression, as well as aberrations in the number of DNA copies—deletions and amplifications with the ability to have a significant effect on the gene's activity. Complex assessment of the chemotherapy's gene expression is important not only for understanding the heterogeneity and molecular biology of breast cancer but also to obtain a more accurate disease prognosis. Thus, the aim of this work was to study the predictive and prognostic significance of the expression and chromosomal aberrations of eight chemosensitivity genes in breast cancer patients.*

Введение. В настоящее время важным аспектом персонализации лечения онкологических больных является установление факта устойчивости и чувствительности к конкретным химиотерапевтическим препаратам [1]. С этой целью в опухолевой ткани возможно определение маркеров химиочувствительности. Экспрессия некоторых генов в опухолевой ткани тесно связана с химиорезистентностью и прогнозом у больных раком молочной железы (РМЖ) [2]. Особый интерес представляют исследования хромосомных aberrаций в локусах данных генов, оказывающие влияние на уровень экспрессии генов [3]. Целью работы является анализ связи экспрессии генов химиочувствительности *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2 α* , *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* с эффектом неoadьювантной химиотерапии (НХТ).

Материалы и методы. В исследование было включено 130 больных РМЖ IIА–IIIВ стадии, получавших в 2006–2020 годах лечение в клиниках НИИ онкологии (г. Томск, Россия). В ретроспективную группу вошли 90 пациенток. Все больные в неoadьювантном режиме получали 2–8 курсов неoadьювантной

химиотерапии (НХТ) по схемам АС, САХ или монотерапию таксотером. Через 3-5 недель после НХТ проводилась органосохранная операция в различном объеме, далее больным проводили лучевую и/или гормональную или таргетную терапию. Для анализа aberrаций числа копий (CNA) проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array. Уровень экспрессии оценивали при помощи ОТ-ПЦР.

Результаты. Установлено, что у больных с наличием объективного ответа на лечение (полная и частичная регрессия) экспрессия *RRM1* выше, по сравнению с пациентами со стабилизацией и прогрессированием ($p=0,04$). Кроме этого, высокие уровни экспрессии генов *TOP2a* и *TYMS* связаны с хорошим ответом на лечение ($p=0,03$). Аналогичный результат показан для гена *TUBB3* у пациентов, пролеченных таксотером в монорежиме. Наличие в биопсии опухоли высокого уровня *GSTP1* сопряжено с низкой эффективностью НХТ по схеме СР ($p=0,05$) (Рис. 1).

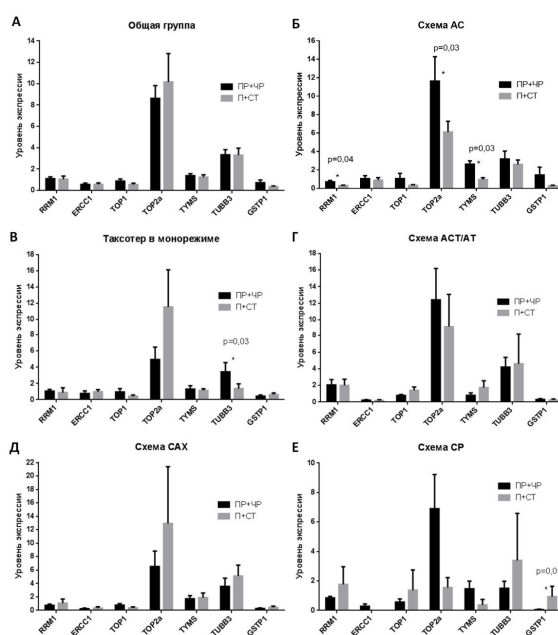


Рис. 1. Диаграммы связи начального уровня экспрессии генов химиочувствительности с эффектом НХТ в общей группе больных и в зависимости от схемы химиотерапии

Анализ показателей безметастатической выживаемости в зависимости от экспрессии, а также CNA исследуемых генов представлен на рисунках 2 и 3. Дальнейший анализ связи наличия хромосомных aberrаций в исследуемых генах химиочувствительности у пациентов с раком молочной железы показал, что CNA слабо коррелирует с эффектом НХТ. Так же показано, что пациенты с гиперэкспрессией *GSTP1* имеют 100% безметастатическую выживаемость (log-rank test $p=0,02$) (Рис. 2).

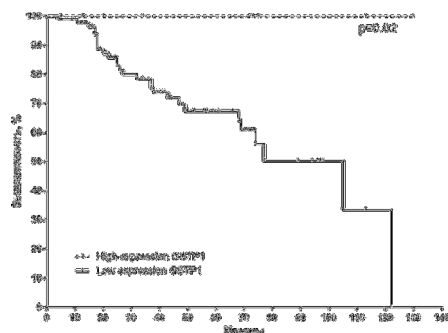


Рис. 2. Кривые безметастатической выживаемости больных РМЖ в зависимости от уровня экспрессии в операционном материале гена *GSTP1*, (log-rank test $p=0,02$)

На уровне выраженной тенденции было показано, что у пациентов с наличием делеции гена *RRM1* наблюдаются лучшие показатели выживаемости по сравнению с нормальной копийностью данного гена и амплификацией. Наличие амплификации гена *GSTP1* обуславливает высокую выживаемость (5-летняя БМВ 86%), тогда как при делеции данный показатель превышает чуть более 50% (Рис. 3).

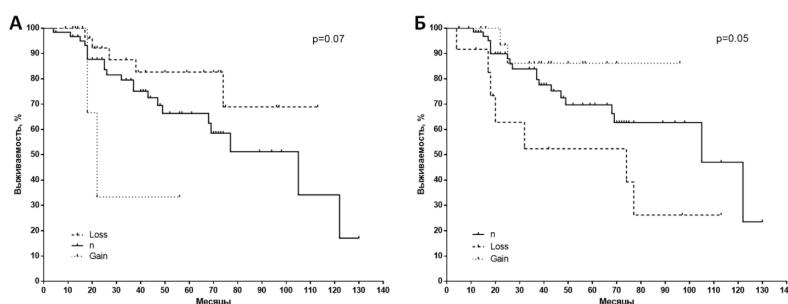


Рис. 3. Кривые безметастатической выживаемости больных раком молочной железы в зависимости от CNA гена *RRM1* (А) и *GSTP1* (Б), (log-rank test $p=0,07$ и $p=0,05$, соответственно)

Заключение. Несмотря на весьма противоречивые результаты о предиктивной и прогностической роли экспрессии и aberrаций числа копий исследуемых генов химиочувствительности, можно сказать, что в будущем оценка данных параметров будет полезна с точки зрения персонализированного подхода к выбору химиотерапевтических препаратов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№ 22-25-00499).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Duffy M.J., Crown J.A. Personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help // *Clinical chemist.* – 2008. – V. 54., №. 11. – P. 1770–1779.
2. Li J., Sun P., Chuang T., He S., Li L., Xue G. Individualized chemotherapy guided by the expression of ERCC1, RRM1, TUBB3, TYMS and TOP2A genes versus classic chemotherapy in the treatment of breast cancer: A comparative effectiveness study // *Oncology Letters.* – 2020. – V. 21., №. 1. – P. 1–1.
3. Horlings H.M., Lai C., Nuyten D.S., Halfwerk H., Kristel P., Van Beers E., Joosse S.A., Klijn C., Nederlof P.M. Integration of DNA copy number alterations and prognostic gene expression signatures in breast cancer patients // *Clinical Cancer Research.* – 2010. – V. 16., №. 2. – P. 651-663.

УДК 577.29

КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВА.Д. Казакова¹, М.А. Ракина¹, И.В. Ларионова^{1,2}

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

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет

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

²Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр РАН

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

E-mail: a.kazakova99@mail.ru**CELLULAR COMPOSITION OF ASCITES IN OVARIAN CANCER**A.D. Kazakova¹, M.A. Rakina¹, I.V. Larionova^{1,2}

Scientific Supervisor: PhD I.V. Larionova

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin Avenue 36, 634050²Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, RAS, Russia, Tomsk, Kooperativny
Street 5, 634009E-mail: a.kazakova99@mail.ru

Abstract. Ovarian cancer (OC) is a common cancer with the highest mortality rate among gynecological tumors. OC is often asymptomatic and diagnosed at late stages [1]. A feature of OC is the predominance of transcoelomic metastatic route through peritoneal fluid [2]. Patients have an abnormal accumulation of fluid, called ascites, starting from second stage of tumor development. Ascites contribute into the tumor development and metastasis [3]. Data on the cellular composition of ascites are contradictory: cancer cell population is fluctuated in the range 1-85%, while the range of immune cells is 10-30% of the total cells, isolated from ascites [4]. Thus, the study of the cellular composition of the ascites in OC is highly relevant.

Введение. Рак яичников (РЯ) – распространенное онкологическое заболевание, имеющее самый высокий уровень смертности по сравнению с остальными гинекологическими опухолями, ввиду того, что зачастую протекает бессимптомно и диагностируется на поздних стадиях [1]. Особенностью РЯ является преобладание перитонеального пути метастазирования над лимфогенным и гематогенным метастазированием [2]. Начиная со второй стадии развития опухоли, у пациентов наблюдается патологическое накопление асцитической жидкости, которая способствует перитонеальной диссеминации опухоли [3]. Имеющиеся количественные данные о клеточном составе асцитической жидкости очень противоречивы: популяция опухолевых клеток колеблется в диапазоне от 1 до 85%, а диапазон популяции иммунных клеток составляет 10-30% от общего количества клеток в асцитической жидкости [4]. Таким образом, задача изучения клеточного состава асцитической жидкости пациентов является актуальной.

Материалы и методы. В исследование было включено 8 больных серозной низкодифференцированной карциномой яичников. В ходе лапароцентеза до проведения химиотерапии и

операции были получены образцы асцитической жидкости. Асцитическая жидкость центрифугировалась, надосадок собирался и замораживался для дальнейших исследований, а полученный клеточный осадок ресуспендировался в фосфатно-солевом буфере (ФБС) и использовался для приготовления цитоспинов. На поверхности стекла клетки фиксировались за счет последовательной обработки растворами 2% параформальдегида (ПФА), разведенном в ФБС, 0,5% Triton X-100, разведенном в ФБС, 4% ПФА, разведенном в ФБС. Цитоспины промывали 3 раза раствором ФБС и хранили при -80°C . Затем готовые цитоспины подвергались 4-цветному иммунофлуоресцентному окрашиванию по стандартной методике. Для субпопуляционного анализа опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ) были использованы следующие антитела: к общему маркеру макрофагов mouse anti-CD68 (Novus BP2-44539, 1:50), к маркерам M2-макрофагов rabbit anti-CD163 (Abcam 182422, 1:100), goat anti-CD206 (R&D BAF 2534, 1:20), rabbit anti-CD204 (Abcam 217843, 1:50), к маркеру ранних моноцитарных макрофагов sheep anti-CD14 (R&D BAF 383, 1:50). Для визуализации опухолевых клеток, Т клеток и фибробластов использовались следующие антитела: mouse anti-multiCK (Dako, RTU), rabbit anti-alpha smooth muscle actin (αSMA) (Abcam 5694, 1:50) и rat anti-CD3 (Abcam 11089, 1:50). Визуализация ядер осуществлялась при помощи флуоресцентного ядерного красителя DAPI (Abcam 104139). Анализ проводился при помощи конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 780 NLO laser scanning spectral confocal microscope (Carl Zeiss, Germany). Все изображения были получены с использованием режима последовательного сканирования.

Результаты. В ходе работы была выявлена гетерогенность клеточного состава асцитической жидкости пациентов. В 5 из 8 проанализированных пациентов отмечалось накопление в асцитической жидкости большого количества макрофагов, экспрессирующих M2 маркеры. В составе асцитической жидкости одного из пациентов макрофаги практически полностью отсутствовали, и основная клеточная масса была представлена опухолевыми клетками, формирующими многоклеточные агрегаты.

Макрофаги идентифицировались по активной экспрессии маркера CD68. Большинство макрофагов было позитивно по CD14, что свидетельствует о том, что макрофаги в асцитической жидкости происходят из рекрутированных моноцитов из кровяного русла, а не являются резидентными. Внутри популяции макрофагов наблюдалась гетерогенность. Было отмечено наличие CD68+/CD163+/CD206+ макрофагов, а также отдельные CD68+/CD206+ и CD68+/CD163+ субпопуляции макрофагов (Рисунок 1).

Для опухолевых клеток была отмечена интересная закономерность. Были отмечены цитокератин-позитивные клетки, которые экспрессируют маркер фибробластов αSMA , что сходится с единичными исследованиями опухолевых сфероидов при раке яичников [5, 6]. Интересно, в случаях с низким содержанием макрофагов, увеличивалось количество опухолевых клеток.

Заключение. В результате работы была подтверждена высокая вариативность клеточного состава асцитической жидкости больных раком яичников.

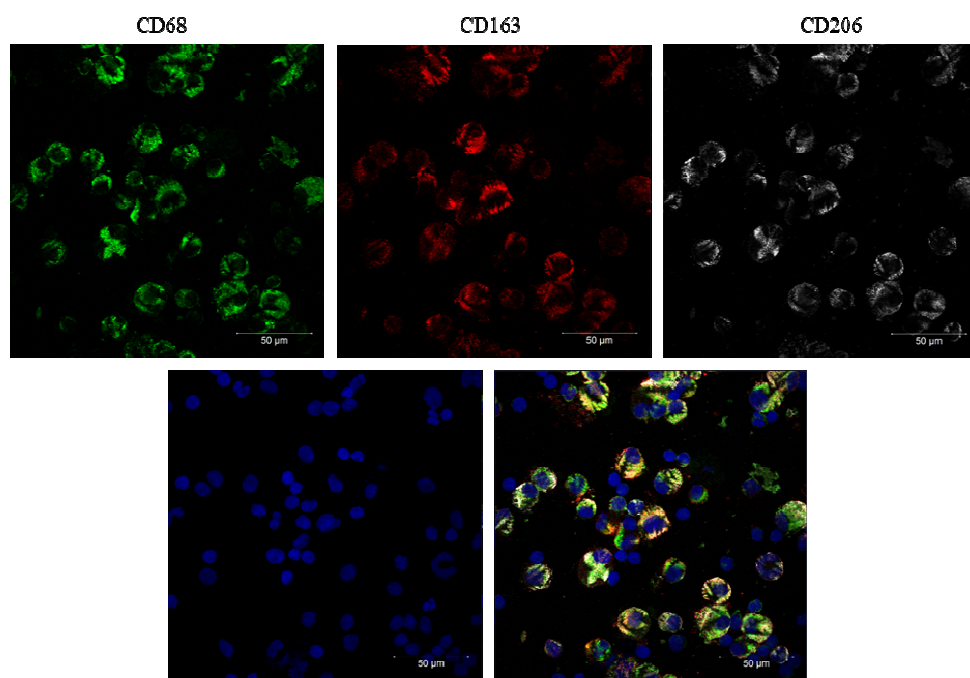


Рис. 1. Иммунофлуоресцентный анализ клеточного состава асцитической жидкости
Примечание: ядра визуализировали синим красителем DAPI (Abscam 104139)

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baci D., Bosi A., Gallazzi M., Rizzi M., Noonan D.M., Poggi A., Bruno A., Mortara L. The ovarian cancer tumor immune microenvironment (TIME) as target for therapy: a focus on innate immunity cells as therapeutic effectors // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21 (9). – P. 3125.
2. Yeung T-L., Leung C.S., Yip K-P., Yeung C.L.A., Wong S.T.C., Mok S.C. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A review in the theme: cell and molecular processes in cancer metastasis // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2015. – Vol. 309 (7). – P. 444-456.
3. Huang L-L., Xia H.H-X., Zhu S-L. Ascitic fluid analysis in the differential diagnosis of ascites: focus on cirrhotic ascites // *J Clin Transl Hepatol.* – 2014. – Vol. 2 (1). – P. 58-64.
4. Adams S.F., Grimm A.J., Chiang C.L-L., Mookerjee A., Flies D., Jean S., McCann G.A., Michaux J., Pak H., Huber F., Neal C., Dangaj D., Bassani-Sternberg M., Rusakiewicz S., Facciabene A., Coukos G., Gimotty P.A., Kandalaft L.E. Rapid tumor vaccine using Toll-like receptor-activated ovarian cancer ascites monocytes // *J Immunother Cancer.* – 2020. – Vol. 8 (2): e000875.
5. Capellero S., Enriquez J., Battistini C., Porporato R., Scotto G., Borella F., Di Renzo M.F., Valabrega G., Olivero M. Ovarian cancer cells in ascites form aggregates that display a hybrid epithelial-mesenchymal phenotype and allows survival and proliferation of metastasizing cells // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23 (2). – P. 833.
6. Sodek K.L., Ringuette M.J., Brown T.J. Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype // *Int J Cancer.* – 2009. – Vol. 124 (9). – P. 2060-2070.

УДК 616.127:616.124.2]-008.6-021.622-092.9

**РОЛЬ β -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В СТРЕССОРНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ СЕРДЦА У КРЫС С
ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННЫМ МЕТАБИОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ**

Б.К. Курбатов, А.П. Никифоров

Научный руководитель: д.м.н. Н.В. Нарыжная

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН,

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

E-mail: Bobersanker@gmail.com

**THE ROLE OF β -ADRENERGIC RECEPTORS IN STRESS-INDUCED HEART INJURY IN RATS
WITH DIET-INDUCED METABOLIC SYNDROME**

B.K. Kurbatov, A.P. Nikiforov

Scientific Supervisor: Dr. N.V Naryzhnaya

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

E-mail: Bobersanker@gmail.com

Abstract. *In this study, we investigate the effect of diet-induced metabolic syndrome in rats on stress-induced cardiac injury. Takotsubo syndrome is currently one of the most important challenges in modern cardiology and pathophysiology. This disease is rare, but dangerous, so mortality is comparable to acute myocardial infarction. One of the dominant theories of the development of this syndrome is the excessive activation of the autonomic nervous system. We have shown that β_1 -adrenergic receptors play an important role in the implementation of stress-induced damage to the heart. That activation of β_2 -adrenergic receptors can limit stress damage to the heart. The study found that stress damage to the heart develops less in animals with diet-induced metabolic syndrome. We have also shown that blockade of β_1 -adrenergic receptors in experimental diet animals causes a lower limit of cardiac stress damage. But the cardioprotective effects of activation of β_2 adrenoreceptors are preserved.*

Введение. Синдром такотсубо на данный момент является важным вызовом для современной кардиологии и патологической физиологии. Так на данный момент нет однозначного понимания патогенетических факторов, лежащих в основе данного синдрома. Одной из наиболее принятых теорий является, что синдром развивается на фоне чрезмерной активации вегетативной нервной системы. На данный момент нет утвержденных схем лечения данного состояния, а также достаточного количества данных для оценки эффективности применяемых схем лечения. Данный синдром обладает достаточно широким коморбидным фоном [1]. Одним из основных коморбидных заболеваний является метаболический синдром. На данный момент не известно, каким образом метаболический синдром влияет на стресс-индуцированное повреждение сердца. Таким образом целью данной работы является определить роль β_1 -, β_2 - адренорецепторов (АР) в стрессорном повреждении сердца при метаболическом синдроме.

Экспериментальная часть. Исследование было проведено на 84 самках крыс Вистар. Животные случайным образом были разделены на 4 группы: интактные, стресс-контроль, стресс-контроль метаболические, стресс + атенолол, стресс + формотерол, стресс-метаболический синдром + атенолол, стресс-метаболический синдром + формотерол. Стрессорное повреждение сердца вызывали с помощью

иммобилизации животных в положении на спине на 24ч. Количественное измерение повреждения сердца производили по оценке степени аккумуляции ^{99m}Tc -Пирфотеха (^{99m}Tc -ПФ). Радиофармпрепарат (РФП) вводили крысам внутривенно в дозе 150 мБК, экспозиция составляла 2 часа. Одновременно с введением РФП происходила наркотизация животных с помощью α -хлоралозы в дозе 100 мг/кг. Затем у наркотизированных животных из грудной клетки извлекалось сердце и промывалось 10 мл холодного физиологического раствора (10 □). После этого сердце радиометрировали с помощью гамма-камеры Phillips (Niderlands). Степень аккумуляции ^{99m}Tc -Пирфотеха выражали как cpm/g (% от введенной дозы) Использовались следующие фармакологические агенты: атенолол, селективный блокатор β 1-АР, вводили четырехкратно в дозе 1,2 мг/кг; формотерол, селективный агонист β 2-АР, вводили четырехкратно в дозе 50 мкг/кг. Диет-индуцированный метаболический синдром моделировали по следующей схеме: животным в течение 90 дней давали корм с высоким содержанием жиров и углеводов (белки 16%, жиры 21%, углеводы 46%, включая 17% фруктозы, 0,125% холестерина), а также производилась замена питьевой воды на 20% процентный раствор фруктозы.

Статистическая обработка полученных данных производилась с помощью статистического пакета Statistica 12 (USA), достоверность различий между группами проверяли с помощью критерия Краскела-Уоллиса с дальнейшим применением апостериорного критерия Данна.

Результаты. У животных, подвергнутых стрессу и содержащихся на стандартной диете, обнаруживается повышение аккумуляции ^{99m}Tc -ПФ по сравнению с интактными животными в 2,5 раза (табл. 1). Блокада β 1-АР с использованием атенолола у животных, содержащихся на стандартной диете, вызвало снижение степени аккумуляции ^{99m}Tc -ПФ в сердце при стрессе на 54%, что указывает на уменьшение стрессорного повреждения сердца (табл. 1). Таким образом активация β 1-АР играет важную роль в развитии стрессорного повреждения сердца. Дополнительная активация β 2-АР уменьшила аккумуляцию ^{99m}Tc -ПФ на 34% по сравнению со стресс-контролем (табл. 1). Имеются данные, что активация β 2-АР обладает антиапоптотическим эффектом [2], который связывают со стимуляцией РКС ϵ [3]. Также известно, что активация β 2-АР вызывает уменьшение синтеза цАМФ в кардиомиоцитах, из-за их способности переключаться с Gs на Gi. В ходе исследований было обнаружено, что у крыс с диет-индуцированным метаболическим синдромом степень аккумуляции ^{99m}Tc -ПФ по сравнению со стресс-контролем уменьшилась на 15% (табл. 1). На основании этих данных можно предположить, что метаболический синдром может обладать кардиопротекторным действием при стрессе. На данный момент имеются противоречивые данные о протекании синдрома такотсубо на фоне сахарного диабета, так некоторые авторы указывают, что у пациентов, у которых протекание синдрома такотсубо происходит на фоне нарушений углеводного обмена, имеют более низкую смертность по сравнению с другими пациентами [4]. Имеются и противоположные данные, так у пациентов с сахарным диабетом наблюдали более высокую смертность, по сравнению со остальными [5]. У крыс, находящихся на экспериментальной диете, блокада β 1-АР вызвала менее выраженный кардиопротекторный эффект, чем у животных, содержащихся на стандартной диете (табл. 1). На основании этих данных можно предположить, что снижение повреждения у метаболических крыс по сравнению с обычными связано именно с изменением функционирования β 1-АР. Использование формотерола для дополнительной активации β 2-АР у животных содержащихся на высокоуглеводной, высокожировой диете вызвало

уменьшение аккумуляции ^{99m}Tc -ПФ, которое не отличается от степени уменьшения у животных на стандартной диете (табл. 1).

Заключение. В результате исследования было обнаружено, что метаболический синдром уменьшает степень повреждения миокарда при стрессе. А также снижает эффективность блокады β 1-АР, и не влияет на эффективность дополнительной активации β 2-АР. На основании этого можно предположить, что активация β 2-АР может быть более предпочтительной мишенью для обеспечения защиты от стрессорных повреждений сердца.

Таблица 1

Степень аккумуляции ^{99m}Tc -Пирфотех в сердце крыс

Параметр/группа	Интактные	Стресс-контроль	Стресс-метаболический синдром	Стресс + атенолол	Стресс + формотерол
^{99m}Tc -Пирфотех, срм/g(%)	0,0503 ± 0,0045	0,1253 ± 0,0163	0,1065 ± 0,008	0,0619 ± 0,0004	0,0826 ± 0,001
Группа/параметр	Стресс-метаболический синдром + атенолол	Стресс-метаболический + формотерол			
^{99m}Tc -Пирфотех, срм/g(%)	0,0852 ± 0,0013	0,0702 ± 0,0014			

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pelliccia F. Comorbidities frequency in takotsubo syndrome: An international collaborative systematic review including 1109 patients // Am J Med – 2015. – Vol. 128., № 6. – P. 654.e11-654.e19.
2. Xu C. β 2-Adrenoceptor confers cardioprotection against hypoxia in isolated ventricular myocytes and the effects depend on estrogenic environment // J Recept Signal Transduct – 2010 – Vol. 30., № 4. – P. 255–261.
3. Fajardo G. β 2-adrenergic receptors mediate cardioprotection through crosstalk with mitochondrial cell death pathways // J Mol Cell Cardiol – 2011. – Vol. 51., № 5. – P. 781–789.
4. Bill V. ‘Diabetes paradox’ in Takotsubo Cardiomyopathy. // Int J Cardiol – 2016. – Vol. 224. – P. 88–89.
5. Stiermaier T. Prevalence and prognostic impact of diabetes In Takotsubo syndrome: Insights from the international, multicenter GEIST registry. // Diabetes Care – 2018. –Vol. 41., № 5. – P.1084–1088.

УДК 616-035.1

**К ВОПРОСУ ПРИМЕНЕНИЯ ЧАТБОТА В РЕАБИЛИТАЦИИ ПОСТИНСУЛЬТНЫХ
ПАЦИЕНТОВ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ**Д.Г. Назметдинова, О.В. Терехина

Научный руководитель: профессор, д.п.н. Н.В. Козлова

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

E - mail: Dilara86@bk.ru

**TO THE QUESTION OF THE APPLICATION OF THE CHATBOT IN THE REHABILITATION OF
POST-STROKE PATIENTS DURING THE PANDEMIC PERIOD**D.G. Nazmetdinova, O.V. TerekhinaScientific Supervisor: Prof., Dr. of Science N.V. Kozlova¹

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

E - mail: Dilara86@bk.ru

Abstract. *The article is devoted to the possibility of using a chatbot as part of the rehabilitation of patients after a stroke. The risk of secondary stroke, limited access to medical facilities, lack of necessary physical activity has forced the scientific community to reconsider approaches and principles for the rehabilitation of post-stroke patients in a pandemic. The use of chatbots in the rehabilitation of post-stroke patients has a number of advantages: computerized home rehabilitation will provide access to rehabilitation treatment for residents of rural and remote areas, solve socio-economic problems, and give patients the opportunity to undergo rehabilitation at home between stages of rehabilitation or after it.*

Введение. Вспышка новой коронавирусной болезни (Sars-CoV -2) в 2019 году оказала огромное влияние на здоровье населения во всем мире. Число инфицированных пациентов с каждым месяцем возрастало, менялись штаммы вируса, модифицировалась симптоматика проявления. Пандемия COVID-19 негативно сказалась и на доступности населения в получении медицинской помощи: до сих пор большая часть медицинского персонала ориентирована преимущественно на работу с пациентами с Covid 19, а некоторые больницы и центры реабилитации перепрофилированы в Covid – госпиталей, либо ориентированы на реабилитацию постковидных пациентов.

Одним из наиболее серьезных неврологических проявлений, угрожающих жизни и повышающих инвалидизацию пациентов COVID-19, является инсульт. Недавние зарубежные исследования доказали влияние вируса на сосудистую сеть внутренних органов, в следствие чего увеличивается риск тромбоза, и повышается риск заболевания инсультом более, чем в 5 раз [1]. Важно отметить, что растущее число тромботических событий, приводящих к острому нарушению мозгового кровообращения среди молодых людей, протекают бессимптомно или имеют только легкие симптомы COVID-19 [1], в свою очередь инсульт приводит к тяжелым неврологическим последствиям. В связи с этим остро как никогда, стоит вопрос пересмотра существующих подходов в комплексной реабилитации пациентов с последствиями инсульта, требующими активной восстановительной помощи.

На заседании совета экспертов в 2020 году Члены Союза реабилитологов России, Всемирной федерации нейрореабилитации, Всероссийского общества неврологов, сочли необходимым запускать третий этап реабилитации, который изначально начинался через год-полтора после инсульта, сразу после окончания второго этапа в стационаре [2]. По мнению экспертов, подобный переход позволит не только сохранить эффект от восстановительного лечения в виде положительной динамики в когнитивных, психоэмоциональных сферах, в восстановлении речи и двигательных нарушениях, но и отслеживать самочувствие постинсультных пациентов в дистанционном формате (использование «телемедицины», онлайн консультации клинического психолога, логопеда, невролога и других специалистов).

С другой стороны, подобная «дистанционная» реабилитация так же ограничена во времени и ресурсах специалистов мультидисциплинарной бригады в условиях загруженности работой с постковидными больными и невозможностью максимального охвата всех постинсультных пациентов. Необходимы новые, инновационные подходы в проведении реабилитационных мероприятий, самоуправления и самоэффективности. Тем более, что современная психологическая реабилитация предполагает использование программ восстановления в рамках концепции «здоровьецентричности», где пациент выступает не в роли пассивного участника восстановительного лечения, а, скорее наоборот, максимально мотивированного активного члена реабилитационного процесса.

Информационные технологии в медицине. Альтернативным вариантом дистанционных консультаций могут выступать технологии на базе искусственного интеллекта в формате чатботов (chatbot). Подобные цифровые технологии хорошо зарекомендовали себя в зарубежной медицинской практике для оперативного сбора анамнеза и постановке точного диагноза, также продемонстрировали положительные результаты в работе с пациентами с черепно-мозговыми травмами и заболеваниями головного мозга, для обучения восстановлению речи, в работе с родственниками пациентов в вопросах предоставления клинической информации и т.д. К примеру, разработанный в 2020 году цифровой помощник «Vigo» с элементами геймификации консультирует, обучает пациентов, перенесших инсульт, и членов их семей по темам, связанным с инсультом, реабилитацией, уходом [1].

Использование чат ботов в реабилитационной практике с пациентами после инсульта должно быть направлено на достижение конкретной значимой цели для пациента: восстановление речи, коррекции когнитивных нарушений, восстановление двигательных нарушений и др. При этом решающую роль играет, как уже было сказано ранее, мотивация, активное включение пациента в процесс реабилитации.

Краткое описание компонентов чатбота в реабилитации пациентов после инсульта. Анализ современных зарубежных и российских публикаций, а также собственные исследования в неврологических клиниках г.Томска показали, что для пациентов, перенесших ишемический инсульт, на первый план в реабилитации выходит восстановление когнитивной сферы (объем, распределение, переключаемость внимания, зрительная/слуховая память), затем работа с тревожностью, коррекция постинсультной апатии и начальных проявлений депрессивной симптоматики и поддержание мотивации.

Таким образом, чатбот в реабилитации постинсультных пациентов должен включать в себя 3 основных модуля. Первый модуль - информационный модуль, включающий информацию об инсульте, связанных с ним проблемах, факторах риска, уходе и т.д. Данный блок ориентирован на избежание иррациональных установок у пациентов, оказавшихся в ситуации болезни, а также позволит родственникам больного ознакомиться со всеми возможными последствиями инсульта, способах ухода,

психологических особенностях пациента в зависимости от степени тяжести заболевания и тем самым также активно вовлекаться в процесс реабилитации в качестве дополнительного ресурса.

Второй модуль, обозначим его как «восстанавливающий», направлен на работу с основными мишенями в комплексной реабилитации: восстановление когнитивных функций за счет использования упражнений по принципу «от простого к сложному», техники релаксации для снятия тревожности, знакомство с эффективными стратегиями преодоления психологических сложностей во время болезни и т.д. В данный блок можно включить элементы психодиагностики с использованием информативных экспресс-методик оценки психоэмоционального состояния пациента и оценки самооффективности на этапе преодоления болезни. И, наконец, третий модуль – мотивационный, предполагает разработку индивидуального ежедневного плана, использование обратной связи, системы балльной оценки для поощрения участия пациента в реабилитационном процессе.

Заключение. Для полноценного восстановления здоровья, качества жизни и возвращения в привычную жизнь реабилитационные мероприятия для постинсультных пациентов необходимо проводить как можно раньше, желательно уже на этапе пребывания пациента в сосудистом центре или в стационаре. Риск вторичного инсульта в результате тромботических свойств COVID-19, ограничения доступа к медицинским учреждениям, отсутствия необходимой физической активности в результате изоляции среди этих пациентов заставил научное общество пересмотреть подходы и принципы реабилитации постинсультных пациентов в условиях пандемии. Все больше востребованным становится применение технологий на базе искусственного интеллекта. Использование чатботов в реабилитации постинсультных пациентов имеет ряд преимуществ: компьютеризированная домашняя реабилитация обеспечит доступность к восстановительному лечению жителей сельских и отдаленных районов, решит социально-экономические проблемы, и даст пациентам возможность проходить курс реабилитации в домашних условиях между этапами реабилитации или после нее. Кроме того, чатбот предлагает пациенту автономию, которой может не хватать в традиционных программах лечения. В целом, активное участие пациента в домашней реабилитации, в процессе собственного медицинского обслуживания и мониторинга результатов, позволит повысить качество жизни реабилитанта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Epalte K., Tomsone S., Patient experience using digital therapy “Vigo” for stroke patient recovery: a qualitative descriptive study // Disability and Rehabilitation: Assistive Technology. – 2020. – P.1-10.
2. Иванова Г.Е., Мельникова Е.В., Левин О.С. Актуальные вопросы реабилитации пациентов с инсультом на фоне новой коронавирусной инфекции (COVID-19) // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2020. – Т.120. – №8. – С.81-87.

УДК: 575.112

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОИСКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ
ПРИ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ
ФАЙЛОВ ГЕНОМНЫХ КООРДИНАТ**

С.Г. Ободзинская, С.Н. Государкина, А.А. Зарубин

Научный руководитель: к.м.н., Н.А. Скрябин

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский
медицинский центр РАН,

Россия, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10, 634050

E-mail: sofya.obodzinskysya@gmail.com

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFICIENCY OF THE SEARCH FOR GENETIC VARIANTS
IN BIOINFORMATICS PROCESSING USING DIFFERENT GENOMIC COORDINATE FILES**

S.G. Obodzinskaya, S.N. Gosudarkina, A.A. Zarubin

Scientific Supervisor: Candidate of Medical Sciences N.A. Skryabin

Research Institute of Medical Genetics Clinic, Russia, Tomsk, Embankment of the river Ushaika., 10, 634050

E-mail: sofya.obodzinskysya@gmail.com

***Abstract.** The study aims to examine exone regions captured via SureSelect Custom DNA Target Enrichment Probes, which are unmentioned in files, provided by the vendor. Variants in these extra regions could be useful to improve the quality of diagnostics of orphan diseases. The quality of reads of extra regions is mostly too low to use them in every diagnostic process, but in situations where it is not possible to find a mutation with a sufficient degree of certainty, it makes sense to expand the region of interest.*

Введение. Массовое параллельное секвенирование - передовая технология генетики, способная оказать значительную помощь в диагностике и обнаружении различных генетически детерминированных заболеваний. Одним из методов, который позволяет улучшить точность диагностики, является использование панелей целевого обогащения. К таким панелям относится SureSelect, метод, позволяющий с помощью конкретных РНК-зондов отобрать из выделенного генетического материала интересующие исследователей участки для последующего секвенирования. Изготавливаемые производителем массово или на заказ панели сопровождаются необходимыми для последующего биоинформатического анализа файлами, содержащими данные о координатах участков генома, в которых с наибольшей вероятностью находятся патологические мутации. Однако, в этих файлах обычно не содержится информация о цельных экзонах, в которых также могут содержаться клинически значимые мутации. **Целью данного исследования** является сравнение результатов генотипирования регионов, включённых в рекомендованную производителем панель, и более расширенной панели, включающей координаты всех экзонов, пересекающихся с данной панелью.

Материалы и методы. Исследуемая библиотека включала в себя 14 образцов. Данные получены на секвенаторе Illumina Miseq с использованием SureSelect Custom DNA Target Enrichment Probes (которые включают экзоны 37 генов общей длиной 168497 нуклеотидов). Обработка сырых данных, от

полученных секвенаторами до файлов, содержащих отличия в экзонах образцов от референсного (hg38) производилась с помощью стандартного пайплайна GATK. Фильтрация полученных файлов по глубине покрытия с целью отсеивания недостаточно достоверных данных ($<50X$) производилась при помощи пакета инструментов vcftools. Аннотация полученных вариантов проводилась с помощью инструмента annovar (использовались базы Clinvar, Gnomad и др.). Оценка качества обработанных данных происходила при помощи инструментов fastqc, bedtools и qualimap. Представление оценки при помощи инструмента multiqc.

Для формирования файла, содержащего информацию о координатах экзонов, захватываемых зондами панели SureSelect взят файл проекта gencode v.39, содержащий информацию о координатах всех экзонов человеческого генома [1-4].

Результаты. Файл, содержащий координаты дополнительно исследуемых участков генома, был сформирован следующим образом: сначала средствами пакета инструментов bedtools на основании файла, содержащего координаты всех участков человеческого генома и файла, предоставленного производителем панели SureSelect был сформирован файл, содержащий координаты всех экзонов, захватываемых панелью. Далее на основании полученного файла и файла производителя при помощи того же пакета инструментов был сформирован искомый файл. Данный файл, а также файл, предложенный производителем, были использованы для определения вариантов в полученных участках.

Анализ дополнительных участков показывает следующее. Их общая длина составила 308292 пар нуклеотидов. Однако, покрытие на дополнительных участках оказалось меньше, чем на участках, гарантированно захватываемых SureSelect. Так, глубина покрытия (≥ 50) встречалась у 6,8 (6,3;7,15)% нуклеотидов на образец, что позволяет проанализировать в среднем около 200 тысяч пар нуклеотидов в каждом образце.

Таблица 1

Сравнение качества покрытия участков, захватываемых и не захватываемых SureSelect

	Процент покрытия (Me (Q1;Q3))					Количество нуклеотидов в регионе
	$\geq 1X$ (%)	$\geq 5X$ (%)	$\geq 10X$ (%)	$\geq 30X$ (%)	$\geq 50X$ (%)	
Области, захватываемые SureSelect	99,9 (99,8; 99,93)	99,7 (99,58;99,73)	99,5 (99,38;99,60)	98,5 (97,9;98,5)	96,2 (94,85;96,55)	51946869 (48362960;55769170)
Остальные регионы в экзонах	22,45 (20,8;23,33)	16,2 (14,95;16,65)	13,55 (12,65;14,30)	9,1 (8,65;9,63)	6,8 (6,3;7,15)	14390451 (13351798;15266742)

Анализ файлов, описывающих варианты, показывает, что не захваченные файлом SureSelect участки экзонов в основном имеют довольно низкое покрытие, в связи с этим значительная часть выявленных вариантов на самом деле приходится на ошибки секвенирования. Для улучшения точности были отобраны и аннотированы варианты с покрытием $\geq 50X$. После фильтрации осталось всего 37 вариантов, встречающихся хотя бы в одном образце и обладающих достаточным покрытием. Эти варианты включают в себя 5 INDEL и 32 SNVs. Один из INDEL определяется как потенциально патогенный (интерпретации этой замены конфликтуют между собой). Данная замена потенциально

приводит к развитию болезни Вильсона-Коновалова и встречается у восьми образцов. 22 замены доброкачественные или вероятно доброкачественные, 14 не аннотированы. Впрочем, диагноз болезнь Вильсона-Коновалова не был поставлен ни одному из всех 14 пациентов.

Заключение. Результаты исследования указывают на то, что дополнительные участки обладают достаточно слабым покрытием, и в них определяется небольшое количество вариантов. Их изучение может потребоваться в тех случаях, когда не удастся найти причинный или дополнительный вариант, который соответствовал бы клинической картине.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Schmitt A, Lenhart J. Et al. Utilizing Agilent SureSelect XT HS2 Target Enrichment and Arima-HiC to Improve Resolution of High Throughput Chromatin Conformation Capture [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://arimagenomics.com/wp-content/files/Application-Note-Utilizing-Agilent-SureSelect-XT-HS2-Target-Enrichment-and-Arima-HiC-to-Improve-Resolution-of-High-Throughput-Chromatin-Conformation-Capture.pdf>. (дата обращения: 22.02.2022)
2. Frankish A. [et al.] GENCODE 2021 // Nucleic Acids Res. – 2021. – Vol. 49 (D). – P. 916-923.
3. Mukherjee S. [et al.] Genetic defects in Indian Wilson disease patients and genotype–phenotype correlation // Parkinsonism and Related Disorders. – 2014. – Vol. 20, №1. – P. 75–81.
4. Landrum M.J. [et al.] ClinVar: improvements to accessing data // Nucleic Acids Res. – 2020. – Vol. 48(D1). – P. 835–844.

УДК 576.343:611.018.26:616-002-008.9

**ОЦЕНКА ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА КЛЕТКАМИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ
У БОЛЬНЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ**И.А. Осихов, О.В. Воронкова

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

Сибирский государственный медицинский университет

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

E-mail: osikhov.25-88@yandex.ru**EVALUATION OF THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY ADIPOSE TISSUE
CELLS IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME**I.A. Osikhov, O.V. Voronkova

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., M.D. Voronkova O.V.

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

E-mail: osikhov.25-88@yandex.ru

Abstract. *According to modern concepts, adipose tissue is not just a passive fat accumulator, but also an endocrine organ active in the metabolic aspect. Basic fat cells: adipocytes synthesize several peptide hormones (leptin, adiponectin, resistin, and visfatin), chemokines and cytokines (monocyte chemoattractant protein-1, tumor necrosis factor alpha, interleukins 1, 6, 8), other biologically active substances (plasminogen activator inhibitor-1, prostaglandins, leukotrienes, etc.). Chronic inflammation of adipose tissue is one of the pathogenetic links of the metabolic syndrome (MS) is a complex of metabolic and hormonal disorders in patients with obesity, hypertension, type 2 diabetes mellitus, and atherosclerosis. Despite the increased interest of researchers in the problem of MS, the molecular and cellular mechanisms of the development of adipose tissue inflammation in MS remain insufficiently studied.*

Введение. Зачастую в научных источниках описывается хроническое (метаболическое, вялотекущее) воспаление, которое вызывает сильные изменения и глубокие нарушения углеводных и липидных обменов. Подобный тип воспаления также отмечается в висцеральной жировой ткани (ВЖТ), затрагивая её структурные и функциональные звенья. Происходящая системная воспалительная реакция становится причиной явных нарушений клеточных обменов в ВЖТ как активного эндокринного органа [1]. При хроническом воспалении возникает усиление свободно-радикального окисления, что ассоциируется повышенным образованием активных форм кислорода (АФК), оказывающих очень важное значение на регуляцию сигнальных систем клетки [2]. Поэтому для определения оценки функциональной активности клеток ВЖТ в настоящей работе устанавливали уровень спонтанной продукции АФК адипоцитами и мезенхимальными стромальными клетками (МСК) у пациентов с метаболическим синдромом (МС) и группы сравнения (лиц без признаков МС).

Экспериментальная часть. Для исследовательских целей были сформированы две группы всех обследуемых пациентов (n=22). В основную группу вошли пациенты с МС (n=16). Группу сравнения составили здоровые лица (n=6). ВЖТ забирали из большого сальника пациентов в процессе плановой эндоскопической холецистэктомии, проводимой строго по всем медицинским показаниям. Из не крупного фрагмента ВЖТ в объеме 1 см³ получали клеточную взвесь адипоцитов и МСК в качестве материала для исследования. Уровень

спонтанної продукції АФК визначалася безпосередньо в день виділення кліток ВЖТ методом проточної цитофлуориметрії. Статистична обробка отриманих результатів проводилася з використанням пакета програм STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., USA). Количесвенні дані представлялись в вигляді медіани, 25-го і 75-го перцентилей – Me (LQ; UQ). Перевірка нормальності розподілення була проведена методом Шапіро-Уїлка. В зв'язі з відсутністю нормального розподілення при порівнянні середніх групових количесвенних ознак був використаний тест Манна-Уїтні (U-тест). Для оцінки статистичної взаємозв'язі між показателями вважали коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r).

Результати. Особливості спонтанної продукції АФК клітками ВЖТ представлені в таблиці 1 і рисунках 1 і 2.

Таблиця 1

Особенности спонтанной продукции активных форм кислорода клетками ВЖТ [Me (LQ; UQ)]

Показатели	Группа сравнения (n=6)	Пациенты с МС (n=16)	p
МСК АФК, усл. ед.	0,332 (0,094;0,553)	0,505 (0,218;1,065)	<0,05
Адипоциты АФК, усл. ед.	0,063 (0,061;0,256)	0,321 (0,135;0,495)	<0,05

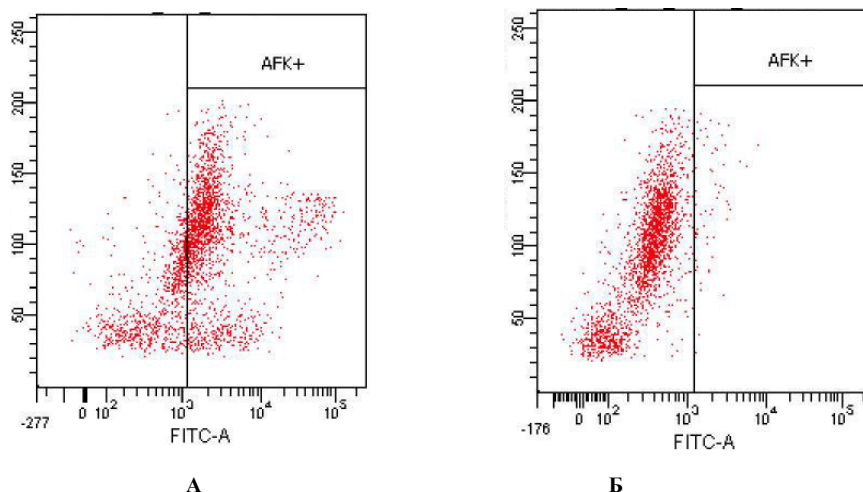


Рис. 1. Спонтанная продукция АФК МСК: А – пациента с МС, Б – «отрицательный» контроль

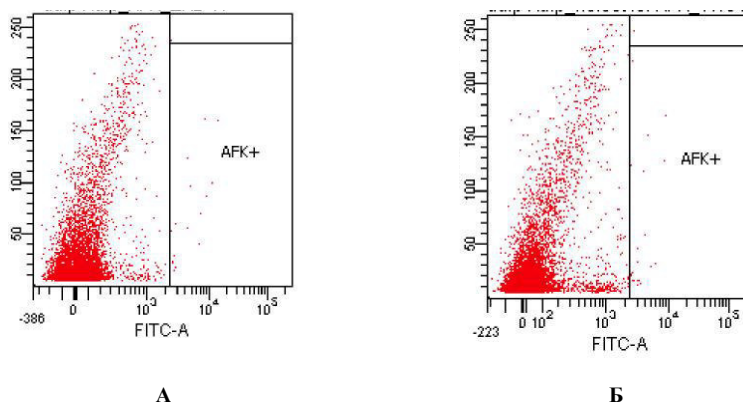


Рис. 2. Спонтанная продукция активных форм кислорода адипоцитами: А – пациента с МС, Б – «отрицательный» контроль

Особенности продукции АФК в ВЖТ отображают уровень клеточного метаболизма, а изменения их концентрации в ходе возникновения и развития МС могут быть основой для появления в организме

разнообразных патогенетических элементов, вызывающих многие отрицательные результаты [2]. Из рисунков 1, 2 и таблицы 1 видно, что выделяемые клетки ВЖТ имеют способность к спонтанной продукции АФК. Заметно, что уровень продукции АФК в МСК как у пациентов с МС, так и у лиц без МС, был больше, чем в адипоцитах ВЖТ. Уровень спонтанной продукции АФК в адипоцитах у пациентов с МС был равен 0,321 (0,135; 0,495) условных единиц и преобладал более чем в 5 раз соответствующие параметры в группе пациентов без МС (0,063 (0,061;0,256)) ($p < 0,05$). Статистически значимое повышение спонтанной продукции АФК адипоцитами у пациентов с МС указывает на усиленную провоспалительную активность в изучаемой линии клеток.

Заключение. Оксидативный клеточный стресс, в основном, сопутствующий с воспалением любого генеза и места положения, является главным элементом развития патогенеза воспаления ВЖТ [3,4,5]. Было выявлено, что важный диагностический параметр характерен для уровня спонтанной продукции АФК адипоцитами для то, чтобы можно было рассматривать данный показатель в роли ещё одного молекулярного и клеточного маркера воспаления ВЖТ при развитии симптомокомплекса МС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васюкова, О.В. Окорочков П.А. Роль специфических шаперонов в патогенезе ожирения и ассоциированных с ним заболеваний // Проблемы эндокринологии. – 2012. - № 4. – С. 48-53.
2. Часовских, Н.Ю., Рязанцева Н.В., Кайгородова Е.В., Чечина О.Е., Соколович Е.Г., Новицкий В.В. Состояние системы MAP-киназ JNK и P38 в мононуклеарных лейкоцитах крови при воспалении // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 6. – С. 515-522.
3. Picklo, M., Claycombe. K.J., Meydani M. Adipose Dysfunction, Interaction of Reactive Oxygen Species, and Inflammation // American Society for Nutrition. Adv. Nutr. – 2012. – Vol. 3. – P. 734 – 735.
4. Kawasaki, N., Asada R., Saito A., Kanemoto S., Imaizumi K. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue // Scientific Reports. – 2012. – N 2(799). – P. 1 – 7.
5. Han, M.S, White A., Perry R.J. et al.. Regulation of adipose tissue inflammation by interleukin 6 // PNAS. – 2020. – Vol. 117. – N. 6. – P. 2751-2760.

УДК 57.084.1

**ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИН
ГИДРОХЛОРИДА В МЕДИЦИНЕ**

О.С. Очиров¹, М.Н. Григорьева¹, В.О. Окладникова^{1,2}

¹Байкальский институт природопользования СО РАН

Россия, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, д.6, 670047

²Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова

Россия, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, д. 24а, 670000

E-mail: ochirov.o.s@yandex.ru

**POSSIBILITY OF USING POLYHEXAMETHYLENEGUANIDINE HYDROCHLORIDE
DERIVATIVES IN MEDICINE**

O.S. Ochirov¹, M.N. Grigor'eva¹, V.O. Okladnikova^{1,2}

¹Baikal Institute of Nature Management SB RAS, Russia, Ulan-Ude, Sakhyanovoi str., 6, 670047

²Buryat State University named after Dorji Banzarova, Russia, Ulan-Ude, Smolina str., 24a, 670000

E-mail: ochirov.o.s@yandex.ru

Abstract. *This work is devoted to describing the possibility of using polyhexamethylene guanidine hydrochloride derivatives in the field of medicine.*

Введение. Разработка технологий получения материалов для применения их в области медицины является актуальной и постоянно востребованной областью исследований, особенно в области химии полимеров. Полигуанидины [1] – класс поликонденсационных полимеров, традиционно используемых в качестве активных компонентов дезинфицирующих средств, однако, высокая реакционная способность гуанидиновой группы открывает возможности использования производных этого класса полимеров в разных областях медицины, начиная от дезинфекции [2] и ранозаживления [3, 4] заканчивая рентгенодиагностикой [5]. Основным представителем гуанидинсодержащих полимеров – является полигексаметиленгуанидин гидрохлорид [2], структура которого использовалась в качестве основы для последующих модификаций. Такой выбор обусловлен тем, что производство этого полимера налажено на многих предприятиях и, следовательно, предлагаемые подходы по модификации структуры могут быть безболезненно внедрены в технологический процесс получения фармацевтических субстанций на его основе.

Цель исследования оценить возможность использования производных полигексаметиленгуанидин гидрохлорида в качестве материалов или самостоятельных препаратов в области медицины.

Экспериментальная часть. Синтез полигексаметиленгуанидин гидрохлорида (ПГМГх) и его производных был осуществлен и исследован методами, описанными в работах [5-7].

Микробиологические методы исследования, примененные в ходе выполнения работ, описаны в работах [8, 9].

Оценка ранозаживляющей активности была проведена на белых крысах линии Wistar в условиях моделирования повреждений кожных покровов [3, 4].

Исследование острой токсичности было проведено путем перорального введения белым мышам в разных дозах [10].

Результаты. Устойчивость бактерий к применяемым дезинфицирующим средствам (ДС) является одной из актуальных проблем здравоохранения, требующих решения, для предупреждения формирования и распространения резистентных штаммов. Решение данной проблемы возможно путем поиска новых или модификации существующих веществ синтетического или растительного происхождения, обладающих антимикробным действием. Одним из представителей такого класса соединений, являются полигуанидины, характеризующиеся высокой антимикробной активностью, низкой токсичностью, и широко используемые в качестве основного действующего вещества многих ДС [1].

ПГМГх, полученный взаимодействием гуанидин гидрохлорида (ГГХ) с алифатическими полиаминами обладает выраженными антимикробными и фунгицидными свойствами. Известно [11], что ряд условно-патогенных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*) представляют наибольшую опасность как возбудители ВБИ. На базе бактериологической лаборатории Республиканской клинической больницы были проведены исследования антимикробной активности производных ПГМГх относительно резистентных штаммов выше перечисленных бактерий. Показано, что наиболее чувствительными ко всем представленным препаратам являются дрожжеподобные грибы *Candida albicans* (полное угнетение), а также метициллин-резистентный *S. aureus*, причем замещенные образцы ПГМГх практически полностью подавляли его рост. Наиболее устойчивыми штаммами являлись *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *K. Pneumoniae*. Процент подавления роста этих бактерий при действии замещенных образцов ПГМГх не превышал 41%, что, по-видимому, объясняется их мультирезистентностью [9].

Была оценена возможность применения ПГМГх в качестве стимулятора репаративной регенерации кожных покровов. Для этой цели был предложен подход к синтезу гидрогелей на основе ПГМГх, основанный на классическом взаимодействии аминокрупп с альдегидами [7], позволяющий получить целевой продукт с хорошим выходом. Был проведен эксперимент по оценке ранозаживляющей активности в условиях моделирования линейной кожно-мышечной раны и термического ожога. В результате эксперимента установлено выраженное ранозаживляющее действие гидрогеля ПГМГх, о чем свидетельствуют результаты ранотензометрии и данные патоморфологических исследований, которые показали более высокую степень созревания грануляционной ткани и прочность рубца [3, 4].

Гидрогели ПГМГх обладают чувствительностью к изменению среды и склонны к деструкции при длительном нахождении в кислой среде [7], в связи с чем, было актуально изучить возможное токсическое влияние на организм животных. Результаты исследования показали отсутствие летальных исходов в остром эксперименте при вводе гидрогеля ПГМГх в дозах 1000, 3000, 5000 и 8000 мг/кг, что и не позволило определить полумлетальную дозу для исследуемого соединения (ЛД₅₀). Проведенные исследования позволили сделать вывод, что данное вещество практически не токсично и может быть отнесено к V классу опасности по ГОСТ 32419-2013 ($2000 < LD_{50} \leq 5000$) [10].

Выводы. Таким образом, разработанные подходы к получению производных полигексаметиленгуанидин гидрохлорида представляют собой лабораторные технологии получения субстанций, проявляющих высокую антимикробную и ранозаживляющую активность и низкую

токсичність, що визначено може представляти інтерес для наступного просчету економічних показателів, сертифікації і розробки на їх основі ефективних засобів і препаратів.

Робота виконана в рамках державного завдання БІП СО РАН № 0273-2021-0007

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Воинцева И.И., Гембицкий П.А. Полигуанидины - дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы. – Москва: ЛКМ-пресс., 2009. – 304 с.
2. Афиногенов Г.Е., Панарин Е.Ф. Антимикробные полимеры. – Санкт-Петербург: Гиппократ, 1993. – 264 с.
3. Очиров О.С., Разуваева Я.Г., Бадмаев Н.С. и др. Ранозаживляющее действие гидрогеля на основе полигуанидинов // Acta Biomedica Scientifica. – 2016. – Т.1. – № 5. – С. 117-120.
4. Лебедева С.Н., Очиров О.С., Стельмах С.А. и др. Ранозаживляющее действие гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида при ожогах. // Acta Biomedica Scientifica. – 2017. – Т.2. – №4. – С. 93-96.
5. Очиров О.С., Стельмах С.А., Григорьева М.Н. и др. Синтез и исследование олигогексаметиленгуанидин гидроиодида в качестве рентгеноконтрастного вещества. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2021. – Т.11. – №3. – С. 491-496
6. Stelmakh S.A., Bazaron L.U., Mogonov D.M. On the mechanism of the hexamethylenediamine and guanidine hydrochloride polycondensation. // Russian Journal of Applied Chemistry. – 2010. – V.83. – №2. – P.342–344.
7. Ochirov O.S., Mogonov D.M., Stelmakh S.A. Polymeric hydrogels based on polyhexamethylene guanidine hydrochloride and formaldehyde. // Russian Journal of Applied Chemistry. – 2015. – V.88. - № 2. – P. 331–334.
8. Stelmakh S.A., Grigor'eva M.N., Garkusheva N.M. et. al. Studies of new biocidal polyguanidines: antibacterial action and toxicity. // Polymer Bulletin. – 2020. – V. 78. – P. 1997-2008.
9. Очиров О.С., Бурасова Е.Г., Стельмах С.А. и др. Антимикробная активность производных полигексаметиленгуанидина гидрохлорида по отношению к мультирезистентным штаммам микроорганизмов. // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т.12. – №1. – С. 193-196.
10. Лебедева С.Н., Очиров О.С., Григорьева М.Н. и др. Острая токсичность гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида. // Acta Biomedica Scientifica. – 2020. – Т.5. - №4. – С. 103-107.
11. Крыжановская О.А., Лазарева А.В., Алябьева Н.М. и др. Устойчивость к антибиотикам и молекулярные механизмы резистентности у карбапенем-нечувствительных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенный: в педиатрических ОРИТ г. Москвы. // Антибиотики и Химиотерапия. – 2016. – Т. 61, – №7-8. – С. 22-26.

УДК 616-006.04

**ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСКРИПТОМА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МОНОЦИТОВ ПРИ РАКЕ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**Е.А. Простакишина¹, П.С. Ямщиков¹, А.А. Фролова^{1,2}

Научный руководитель: М.Р. Патышева

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050² Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр РАН,
Россия, г. Томск, пер. Кооперативный 5, 34009E-mail: elprostakishina@yandex.ru**TRANSCRIPTOME CHARACTERIZATION OF THE CIRCULATING MONOCYTES IN BREAST
CANCER PATIENTS**E.A. Prostakishina¹, P.S. Yamschikov¹, A.A. Frolova^{1,2}

Scientific Supervisor: M.R. Patysheva

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050²Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, RAS, Russia, Tomsk, Kooperativny str.,
5, 34009E-mail: elprostakishina@yandex.ru

Abstract. *Circulating monocytes are the main source of tumor-associated macrophages. It has been shown that blood monocytes can have certain transcriptional, epigenetic, and metabolic programs mediated by the presence of solid carcinomas. On the other hand, monocytes are direct participants in inflammation, which is a significant pathogenetic factor in neoplasia. The aim of the research was to investigate the extent to which the transcriptome profile of monocytes is associated with the presence of breast cancer (BC) and whether the obtained data can be of clinical value. It was found that the transcriptome of monocytes in BC differs from the transcriptome of monocytes of healthy women for the CD14+ cells. 31 genes were also identified with overexpression with $adj.p.val < 0.05$ and $log_2FC \geq 0.75$ in monocytes in BC. Data were obtained on a significant increase in the level of transcripts of the ABCA1, DDIT4, PLIN1 and CXCR4 genes in BC group during the validation of the results of the monocyte transcriptome.*

Актуальность. Рак молочной железы (РМЖ) является одной из ведущих причин смертности женщин от злокачественных опухолевых заболеваний [1]. В последние годы в фокусе изучения находятся компоненты опухолевого микроокружения и, прежде всего, опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ). В большинстве моделей рака ОАМ рекрутируются из циркулирующих моноцитов. Показано, что моноциты крови могут иметь определённые транскрипционные, эпигенетические и метаболические программы, опосредованные присутствием солидных карцином [2, 3]. С другой стороны, моноциты являются непосредственными участниками воспаления, которое является значимым патогенетическим фактором неоплазий.

Целью исследования было изучить, в какой степени транскриптомный профиль моноцитов связан с наличием РМЖ и могут ли полученные данные иметь клиническую ценность.

Материалы и методы. Когорта исследуемых включала: группы пациенток с РМЖ (n=9) и здоровых женщин (n=5) для РНК-секвенирования; для валидации исследовалась независимая выборка из пациенток с РМЖ (n=18) и здоровых женщин (n=8). В качестве материала использовалась цельная кровь, из которой были выделены CD14+ моноциты с последующим получением тотальной РНК. Массовое параллельное секвенирование транскриптома моноцитов проводилось на платформе NextSeq 550, Illumina. Валидация результатов секвенирования была проведена методом количественной ПЦР в режиме реального времени по технологии TaqMan.

Результаты. Анализ транскриптома и оценка его общей картины после массового параллельного секвенирования был проведен с помощью метода главных компонент (PCA), который выявил, что транскриптом CD14+ моноцитов при РМЖ отличается от транскриптома CD14+ моноцитов здоровых женщин (Рис. 1).

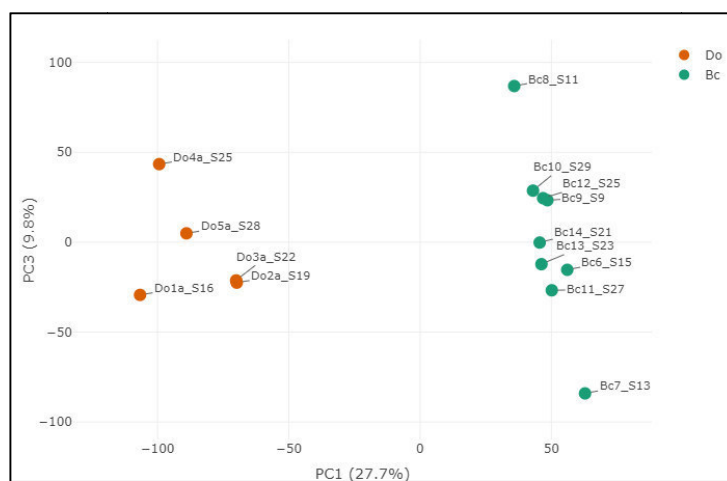


Рис. 1. Отличия транскриптома CD14+ моноцитов пациенток с РМЖ и здоровых женщин. Do1a-5 – пробы здоровых женщин, Bc6-14 – пробы пациенток с РМЖ

При биоинформатическом анализе транскрипционного профиля моноцитов пациенток с РМЖ при сравнении этих групп с моноцитами здоровых женщин были выявлены группы дифференциально экспрессированных генов. При этом экспрессия 364 генов была повышена в моноцитах при РМЖ с $p.val < 0,05$ и $\log_2FC \geq 0,75$, а 31 ген был гиперэкспрессирован с $adj.p.val < 0,05$ и $\log_2FC \geq 0,75$: *DDIT4*, *CLU*, *PLIN2*, *THBD*, *MAFB*, *JUN*, *PFKFB3*, *ABCA1*, *MXI* и др. У 302 генов была отмечена гипоэкспрессия в группе пациенток ($p.val < 0,05$ и $\log_2FC \leq 0,75$) и у 8 генов отмечалась выраженная экспрессия с $adj.p.val < 0,05$ и $\log_2FC \geq 0,75$. Что интересно, часть генов с гиперэкспрессией по их биологической значимости, участвуют в программировании моноцитов как в направлении M1 (противоопухолевой), так и в M2 (проопухолевой) активности. Так, например, *DDIT4*, *JUN*, *ABCA1*, *PFKFB3* участвуют в направлении M2 активности, а *THBD*, *CXCR4* – M1. При этом *MAFB* обладает возможностью в программировании моноцитов в обоих направлениях. Про- или противовоспалительная направленность, определяемая найденными генами, не дает основание отнести программирование моноцитов строго в M1 или M2-направлении. Это подтверждает предположение о том, что более корректно ориентироваться на функциональную характеристику маркера.

При валидации результатов транскриптомного исследования моноцитов были получены данные о достоверном повышении уровня транскриптов генов *ABCA1* (в 3,7 раз, $p=0,009$), *DDIT4(RED D1)* (в 6,4 раза, $p=0,01$), *PLIN1* (в 1,3 раза, $p=0,06$), *CXCR4* (в 1,73 раза, $p=0,03$) в моноцитах в группе больных РМЖ ($p \leq 0,05$) (Рис. 2).

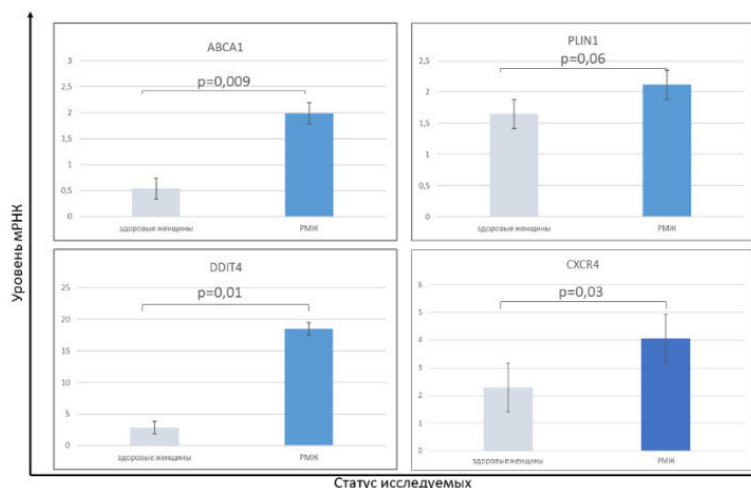


Рис. 2. Уровень экспрессии генов *ABCA1*, *PLIN*, *DDIT4* и *CXCR4* моноцитов пациенток с раком молочной железы и здоровых доноров, подтвержденная с помощью количественной ПЦР в реальном времени

Заключение. Моноциты пациенток с РМЖ имеют выраженные особенности транскриптомного профиля по сравнению со здоровыми донорами. Экспрессия генов *ABCA1*, *PLIN*, *DDIT4* и *CXCR4* в моноцитах отличает группу больных от группы здоровых, что дает основание для дальнейшего исследования роли этих молекул в реализации функции моноцитов при РМЖ.

Работа поддержана государственной программой Министерства науки и высшего образования Российской Федерации «Генетическое и эпигенетическое редактирование опухолевых клеток и микроокружения с целью блокирования метастазирования» № 075-15-2021-1073.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang B., Cao M., He Y., Liu Y., Zhang G., Yang C., Du Y., Xu J., Hu J., Gao F. Increased circulating M2-like monocytes in patients with breast cancer // *Tumor Biology*. – 2017. – V.39., №6. – P. 1–10.
- Cassetta L., Fragkogianni S., Sims A.H., Swierczak A., Forrester L.M., Zhang H., Pollard J.W. Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming, Biomarkers, and Therapeutic Targets // *Cancer Cell*. – 2019. – V.35., №4. – P. 588–602.
- Patysheva M., Larionova I., Stakheyeva M., Grigoryeva E., Iamshchikov P., Tarabanovskaya N., Weiss C., Kardashova J., Frolova A., Rakina M., Prostakishina E., Zhuikova L., Cherdyntseva N. Kzhyshkowska J. Patysheva M., Effect of Early-Stage Human Breast Carcinoma on Monocyte Programming [Текст : электронный] // *Front. Oncol.* – 2022.

УДК 577.29

**АНАЛИЗ ГЕНОГО ПРОФИЛЯ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ КИШЕЧНИКА
И МАКРОФАГОВ, ВЫРАЩЕННЫХ В КО-КУЛЬТУРЕ, В ОТВЕТ НА ХИМИОТЕРАПИЮ *IN VITRO***

М.А. Ракина¹, Е.О. Казакова¹, И.В. Ларионова^{1,2}

Научный руководитель: к.м.н., И.В. Ларионова^{1,2}

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет

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

²Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский

медицинский центр РАН

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

E-mail: militsarakina@mail.ru

**GENE EXPRESSION PROFILING OF COLORECTAL ADENOCARCINOMA CELLS
AND MACROPHAGES GROWN IN CO-CULTURE IN RESPONSE TO CHEMOTHERAPY *IN VITRO***

M.A. Rakina¹, E.O. Kazakova¹, I.V. Larionova^{1,2}

Scientific Supervisor: Ph.D., I.V. Larionova^{1,2}

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin Avenue, 36, 634050

²Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS, Russia, Tomsk, Kooperativny

Street, 5, 634009

E-mail: militsarakina@mail.ru

Abstract. *Colorectal cancer (CRC) is one of the most common and fatal malignancies in the world [1]. Tumor-associated macrophages (TAM) are key cells of innate immunity and in tumor microenvironment that constitute up to 50% of cells and play a crucial role in tumor progression [2]. Chemotherapy (CT) is considered as one of the main types of anticancer treatment for solid tumors. However, in colon cancer its effectiveness is hindered due to various reasons, one of them being TAMs. In particular, their involvement in tumor response to CT or more accurately lack thereof [2]. Thus, we studied gene expression profile of monocyte-derived TAMs from CRC patients and adenocarcinoma cancer cells grown in coculture for the presence of markers of M2 polarization, epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis and invasion in response to stimulation with various chemotherapy anticancer drugs in vitro.*

Введение. Колоректальный рак (КРР) является одним из наиболее распространенных и летальных злокачественных новообразований в мире. Согласно данным ВОЗ, в 2020 году было диагностировано более 1,9 миллиона новых случаев КРР, и зарегистрировано около 500 тысяч смертей по всему миру [1].

Опухолессоциированные макрофаги (ОАМ) являются ключевыми клетками врожденного иммунитета опухоли. ОАМ включаются в поддержку опухоли на всех этапах ее развития – рост, ангиогенез, инвазия и метастазирование, колонизация, рецидивирование и ответ на терапию [2].

Химиотерапия (ХТ) – один из основных видов противоопухолевого лечения солидных опухолей. Однако, ее эффективность, несмотря на развитие новых химиотерапевтических агентов при КРР, достигает не более 50%, и на данный момент важнейшей задачей клинической онкологии является

повышение эффективности противоопухолевой терапии. Известно, что иммунная система, и, в частности, ОАМ, играют роль в исходе ХТ лечения, и способствуют отсутствию ответа опухоли на химиотерапию [2]. Изучение программирующего действия ХТ агентов на макрофаги позволит выявить новые биомаркеры эффективности противоопухолевой терапии и обнаружить новые мишени для комбинированной иммуно- и химиотерапии.

В настоящем исследовании был проведен анализ генного профиля опухолевых клеток линии аденокарциномы кишечника Caco2 и SW837 и макрофагов, полученных из моноцитов больных РТК, выращенных в ко-культуре, на наличие маркеров M2 поляризации, эпителиально-мезенхимального перехода, ангиогенеза и инвазии, в ответ на добавление разных ХТ противоопухолевых препаратов *in vitro*.

Материалы и методы. В настоящем исследовании использовались линии опухолевых клеток колоректального рака – Caco-2 (аденокарцинома ободочной кишки) и SW837 (аденокарцинома прямой кишки (4 стадия заболевания, метастатический рак), а также моноциты, выделенные из крови больных КРР методом магнитной сепарации.

Работа с клеточными культурами проводилась в соответствии со стандартными методиками. Для начала моноциты от здоровых доноров и пациентов больных КРР выделяли путем CD14-позитивной магнитной сепарации и высаживали в 24-луночный планшет в количестве 700 тысяч/луночка в среде X-VIVO (Lonza), отдельно моноциты пациентов с раком прямой кишки (РПК) и раком ободочной кишки (РОК). К моноцитам в культуру добавляли 10 нг/мл M-CSF и IL-4, dex⁸. Культивировали клетки в течение 4 дней. На 4 день меняли среду на DMEM+5% FBS и подсаживали клетки линии Caco2 к моноцитам пациентов с РОК, а клетки линии SW837 к моноцитам пациентов с РПК. Моноциты от доноров использовались для ко-культуры с обеими клеточными линиями. Через 2 дня по достижении опухолевыми клетками 70-80% конфлюентности добавлялись химиотерапевтические препараты.

Разделение макрофагов и опухолевых клеток из ко-культуры производили при помощи клеточного сортера (Sony SH800). В эксперимент вошли 3 донора и 3 пациента, 2 с РПК и 1 с РОК. Были установлены следующие комбинации для каждого донора: не стимулированная ко-культура макрофагов с опухолевыми клетками (Caco2, SW837), ко-культура со стимуляцией IRI (в случае культуры с SW837 + стимуляция 5-FU). Для контроля использовались макрофаги без опухолевых клеток также без стимуляции, с IRI и с 5-FU, и опухолевые клетки без макрофагов не стимулированные, стимулированные IRI и 5-FU. Для пациентов комбинации были соответственными, за исключением того, что моноциты от пациентов с РПК культивировали только с SW837, а с РОК – только с Caco2. Клетки снимали при помощи трипсина, переносили в пробирку, добавляли антитела к лейкоцитарному антигену CD45 (Sony biotechnology, 2120070), к эпителиальным клеткам (опухолевым) CD326 (Ep-CAM) (Sony biotechnology, 2221030) и 7AAD – краситель для определения жизнеспособности клеток. Инкубировали 15 минут, а затем проводили сортировку в соответствии с протоколом. После сортировки из выделяли РНК и синтезировали кДНК. ПЦР анализ проводился на полученных кДНК пробах (65 проб) для следующих генов, маркеров ангиогенеза, эпителиально-мезенхимального перехода и метастазирования: CDH1, MMP9, SNAI, SPP1, S100A4, SPARC, VEGF, EGF.

Результаты. Главные различия наблюдались в экспрессии генов SPP1, S100A4, SPARC и MMP9. Экспрессия S100A4 была повышена при стимуляции иринотеканом в макрофагах из ко-культуры по сравнению с не стимулированным контролем ($p=0,04$). Наоборот, экспрессия SPARC и SPP1 понижалась

при стимуляції іринотеканом ($2,81 \pm 0,57$ vs. $0,87 \pm 0,34$, $p=0,02$). Інтересно, що експресія S100A4 і SPARC понижалась в макрофагах пацієнтів по порівнянню з донорами як в ко-культури, так і без ко-культури (Рисунок 1А, В). В то время как експресія SPP1 була підвищена в макрофагах пацієнтів в ко-культури по порівнянню з донорами при стимуляції іринотеканом ($3,87 \pm 1,80$ vs. $0,52 \pm 0,36$, $p=0,02$) (Рисунок 1С). Ці результати ще раз вказують на дисбаланс в експресії ангіогенних регуляторів в колоректальному раку. Експресія MMP9 підвищувалась в опухольових клітках пацієнтів КРР з ко-культури, но понижалась в опухольових клітках не з ко-культури ($p=0,04$) (Рисунок 1Д). Відсутність різниць для інших генів ймовірно всіма пов'язані з маленькою вибіркою.

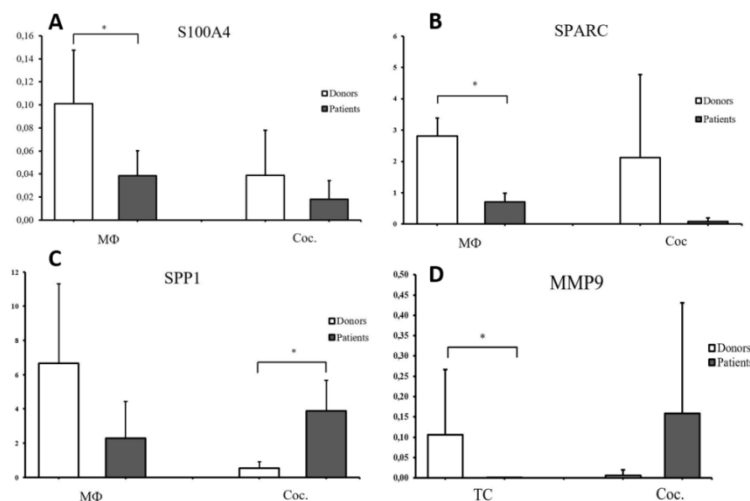


Рис.1. Результати ПЦР аналізу експресії S100A4 (А), SPARC (В), SPP1 (С) і MMP9 (Д) в ко-культури і клітках без ко-культури (МФ – макрофаги, ТС – tumor cell, опухольові клітки) в пацієнтах і здорових донорах

Заключення. В результаті дослідження були виявлені різниці в експресії генів SPP1, S100A4, SPARC і MMP9 в відповідь на стимуляцію іринотеканом і сокультивування макрофагів і опухольових кліток.

Робота підтримана грантом РФФІ № 20-015-00384.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sung H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries //CA: a cancer journal for clinicians. – 2021.
2. Larionova I. et al. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy //Oncoimmunology. – 2019. – V. 8. – №. 7.

УДК 616.345

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИОННОГО ПРОФИЛЯ ФОСФАТАЗ ДВОЙНОЙ
СПЕЦИФИЧНОСТИ (DUSP) В МОНОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ**К.А. Раченков¹, П.С. Ямщиков², М.С. Дорофеева³Научный руководитель: М.Р. Патышева³¹Сибирский государственный медицинский университет,

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

² Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

³Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский

медицинский центр РАН,

Россия, г. Томск, пер. Кооперативный 5, 34009

e-mail: rachenkovkirill13@gmail.com**EXPRESSION PROFILE OF DUAL SPECIFICITY PHOSPHATASE (DUSP) IN MONOCYTES FROM
PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER**Rachenkov K.A.¹, Iamshchikov P.S.², Dorofeeva M.S.²

Scientific Supervisor: M.R. Patysheva

¹Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovsky trakt, 2, 634050² Tomsk State University, Tomsk, Russia, Lenina, 36, 634050³Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, RAS, Russia, Tomsk, Kooperativny Str.,

5, 34009

e-mail: rachenkovkirill13@gmail.com

Abstract. *Circulating monocytes are an important component of the body's nonspecific immunity. Those cells are the main source of formation of tumor-associated macrophages (TAM). Currently known that the variety of inflammation options in tumor tissue is due to the predominant development of different types of immune responses in it, which are associated with pro- or antitumor differentiation of macrophages. To maintain a controlled and balanced course of the immune response, a clear and well-coordinated work of the cascades of activation and phosphorylation of kinases that regulate the activation of protective cells is required. The dual-specific phosphatase (DUSP) gene family includes several enzyme subtypes that are expressed differently in resting and activated immune cells. They control the duration and intensity of phosphorylation signals. The study of DUSP gene expression and transcriptome in monocytes of patients with oncological diseases seems to be a promising direction in oncoimmunology. The aim of this work is to study the expression profile of DUSP in patients with colorectal cancer and in patients without this pathology. The aim of the experiment was also to study the transcriptome of monocytes and to identify differences between groups. During the analysis, it was found that the monocyte fraction in both patients and healthy women was represented by 3 cell clusters, each of which contained transcripts of the DUSP family genes. Regardless of the study groups, DUSP1, DUSP6, were detected in significant amounts, which indicates their functional significance for monocytes. Elucidation of the role of DUSP in the regulation of the immune response of cells in the future can be used for its targeted*

pharmacological modulation in patients with cancer and nosologies in which immune responses and inflammation play a significant role in pathogenesis.

Введение. Известно, что взаимодействие иммунной системы и опухолевого новообразования базируется на балансе между провоспалительной активацией и противовоспалительной супрессией иммунных процессов. При этом, опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) и моноциты как их предшественники выполняют функцию основных регуляторов опухолевого микроокружения. Было показано, что циркулирующие моноциты могут иметь определённые транскрипционные программы, опосредованные присутствием опухолей молочной железы [1, 2]. В гетерогенной популяции клеток моноцитарно-макрофагального ряда могут присутствовать как клетки, обеспечивающие противоопухолевый иммунный ответ, так и поддерживающие процесс неоплазии. При этом течение иммунного ответа должно подвергаться чёткому контролю, а поиск его ключевых регуляторов представляется актуальной задачей для многих нозологий, ассоциированных с вовлечением моноцитов. Каскадные процессы активации и фосфорилирования ферментов – киназ являются одними из ключевых биологических путей, отвечающих за осуществление противоопухолевого ответа иммунных клеток. Семейство фосфатаз с двойной специфичностью (DUSP) включает несколько подтипов ферментов, которые по-разному экспрессируются в покоящихся и активированных иммунных клетках и определяют исход иммунного ответа. Так выявлено, что DUSP зависимая активация макрофагов, одним и тем же стимулом может привести к продукции разных клеточных эффекторов [3, 4]. Так DUSP5 индуцировал клетки-предшественники дифференцироваться в сторону гранулоцитов в ответ на M-CSF, ингибируя ERK1/2 [4]. Таким образом фосфатазы DUSP вовлечены в реализацию воспалительных программ клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Таким образом, исследование экспрессионного профиля молекул DUSP в моноцитах представляется перспективным направлением для онкоиммунологии.

Цель работы: исследовать экспрессию спектра генов фосфатаз семейства DUSP в моноцитах периферической крови пациентов с колоректальным раком (КРР) в сравнении со здоровыми донорами.

Материалы и методы: В исследование вошли 2 пациентки с КРР и 2 здоровых добровольцев. Из венозной крови методом проточной цитофлуориметрической сортировки были получены CD14+ моноциты. После проточной сортировки по 5 тысяч клеток были подвергнуты криоконсервации при -190°C (жидкий азот) от 1 до 4 мес. В день эксперимента во всех пробах было проведено РНК-секвенирование единичных клеток на платформе Chromium 10x Genomic. Подготовленные библиотеки пулировали и проводили секвенирование на приборе Illumina NextSeq500 с набором реактивов для одноконцевого чтения 1x200 (single read), 75 циклов. Биоинформатический анализ проводился с помощью программного обеспечения Cell Ranger и набора виджетов Seurat.

Результаты. Анализ транскриптома единичных клеток позволил выявить, что популяция CD14+ моноцитов представлена 3 кластерами клеток, в каждой из которых были представлены транскрипты генов семейства DUSP вне зависимости от принадлежности к группе пациентов или к контрольной группе. Один из кластером отличался обогащением транскриптов комплекса HLA-DR: HLA-DPA1 ($\log_{2}\text{FC} \geq 1.146$; $\text{adj.p.val} \leq 1.599\text{e-}104$), HLA-DRA ($\log_{2}\text{FC} \geq 0.8433$; $\text{adj.p.val} \leq 1.358\text{e-}96$), HLA-DPB1 ($\log_{2}\text{FC} \geq 1.046$; $\text{adj.p.val} \leq 3.647\text{e-}92$), HLA-DRB1 ($\log_{2}\text{FC} \geq 0.712$; $\text{adj.p.val} \leq 2.31\text{e-}72$) и CD74 ($\log_{2}\text{FC} \geq 0.5662$; $\text{adj.p.val} \leq 1.584\text{e-}75$), отвечающими за антиген-презентирующую функцию клеток. Второй

кластер отличался повышенной экспрессией генов S100A, причем S100A8 ($\log_{2}FC \geq 1.122$; $\text{adj.p.val} \leq 1.617e-118$), S100A9 ($\log_{2}FC \geq 1.024$; $\text{adj.p.val} \leq 1.47e-104$), S100A12 ($\log_{2}FC \geq 0.9508$; $\text{adj.p.val} \leq 2.034e-90$), что характерно для процесса дегрануляции моноцитов и нейтрофилов, предшествующей миграции этих клеток через эндотелий из сосудов в ткань (Рисунок 1, А). Самый малочисленный кластер (кластер 3) характеризовался экспрессией генов IFIT1 ($\log_{2}FC \geq 1.015$; $\text{adj.p.val} \leq 3.054e-43$), IFIT3 ($\log_{2}FC \geq 1.241$; $\text{adj.p.val} \leq 1.275e-31$) и SIGLEC1 ($\log_{2}FC \geq 0.3272$; $\text{adj.p.val} \leq 9.815e-20$) вовлеченных, в реализацию провоспалительной функции моноцитов (Рисунок 1, А). Анализ экспрессии маркеров показал, что в моноцитах семейство DUSP представлено DUSP2, DUSP5, DUSP7, DUSP10, DUSP11, DUSP18, DUSP28 в следовых количествах, в то время как DUSP1 ($\log_{2}FC = 0,1-5,0$, $Me=2,3$), DUSP3 ($\log_{2}FC = 0 - 2,5$, $Me=0,4$), DUSP6 ($\log_{2}FC = 0,1-4,5$, $Me=2,0$), DUSP22 ($\log_{2}FC = 0,1-3,0$ $Me=0,46$) экспрессированы более выражено и для группы пациентов, и для группы доноров. При этом в кластере моноцитов, ассоциированном с провоспалительной функцией, была выражена экспрессия двух представителей семейства DUSP, а именно DUSP1 - $\log_{2}FC = 0,95 - 4,31$, $Me=2,7$ для «провоспалительного» кластера, против $\log_{2}FC = 0,54 - 5,00$, $Me=2,17$ и $\log_{2}FC = 0,5 - 4,6$, $Me=2,52$ в двух других, а для DUSP6 - $\log_{2}FC = 0 - 4,2$, $Me=2,57$ для «провоспалительного» кластера, против $\log_{2}FC = 0 - 4,5$, $Me=2,16$ и $\log_{2}FC = 0 - 4,7$, $Me=2,16$ в двух других (Рисунок 3, Б).

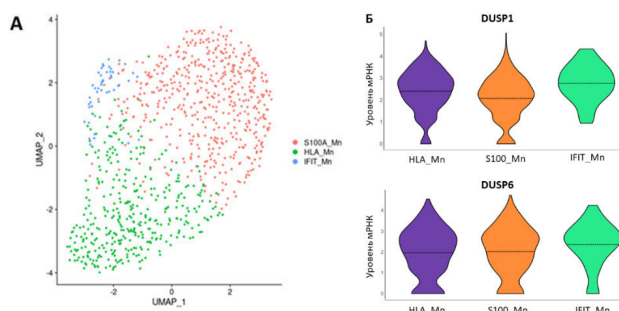


Рис. 1. А - Транскриптомная характеристика в моноцитах пациентов с КРР и здоровых лиц, определённая с помощью секвенирования единичных клеток; Б - экспрессия DUSP1 и DUSP6 в кластерах моноцитов

Заключение. Выявленная экспрессия генов фосфатаз DUSP1, DUSP3, DUSP6 и DUSP22 доказывает их значимость для реализации функции моноцитов как при КРР, так и у здоровых лиц. DUSP1 и DUSP6 имеют более выраженную биологическую роль при вовлечении моноцитов в иммунный ответ и являются потенциальными кандидатами для дальнейшего исследования и последующей таргетной модуляции иммунновоспалительных реакций в том числе и при онкологических заболеваниях.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда N 22-25-00435.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cassetta, L., Fragkogianni, S., Sims, A. H., Swierczak, A., Forrester, L. M., Zhang, H., Pollard, J. W. Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming, Biomarkers, and Therapeutic Targets // Cancer Cell. – 2019. – Т.35., – №4. – С. 588–602.

2. Patysheva M., Larionova I., Stakheyeva M., Grigoryeva E., Iamshchikov P., Tarabanovskaya N., Weiss C., Kardashova J., Frolova A., Rakina M., Prostakishina E., Zhuikova L., Cherdyntseva N. Kzhyskowska J. Effect of Early-Stage Human Breast Carcinoma on Monocyte Programming // *Front. Oncol.* – 2022. – №11. – С. 800235.
3. Neamatallah T., Jabbar S., Tate R., Schroeder J., Shweash M., Alexander J., Plevin R. Whole Genome Microarray Analysis of DUSP4-Deletion Reveals A Novel Role for MAP Kinase Phosphatase-2 (MKP-2) in Macrophage Gene Expression and Function // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2019. – №20. – С. 3434.
4. Grasset M.-F., S. Gobert-Gosse G. Mouchiroud, R.P. Bourette. Macrophage differentiation of myeloid progenitor cells in response to M-CSF is regulated by the dual-specificity phosphatase DUSP5 // *Journal of Leukocyte Biology.* – 2010. – №87. – С.127-135.

УДК 571.27

СЕКРЕТИРУЕМЫЕ БИОМАРКЕРЫ МАКРОФАГОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ РАКАT.C. Сударских¹, М.А. Ракина¹, Е.Г. Шаповалова¹Научный руководитель: к.м.н., И.В. Ларионова^{1,2}¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

²Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский

медицинский центр РАН,

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

E-mail: tanya-sudarskih@mail.ru**SECRETED MACROPHAGE BIOMARKERS IN VARIOUS TYPES OF CANCER**T.S. Sudarskikh¹, M.A. Rakina¹, E.G. Shapovalova¹Scientific Supervisor: Ph.D., I.V. Larionova^{1,2}¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin Avenue, 36, 634050²Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, RAS, Russia, Tomsk, Kooperativny

Street, 5, 634009

E-mail: tanya-sudarskih@mail.ru

Abstract. *Tumor-associated macrophages (TAMs) are key innate immune cells in tumor microenvironment (TME) that regulate growth of primary tumors, antitumor adaptive immune response, tumor angiogenesis, extracellular matrix remodeling, intravasation in the vasculature, extravasation in metastatic sites [1]. TAMs are highly heterogeneous cells, and their variability strongly depends on cancer type, stage and intratumor heterogeneity. In this work, secreted biomarkers of macrophages in various types of cancer were studied. The differences in secreted profile of TAMs in breast, rectal, lung, ovarian and prostate cancers were revealed.*

Введение. Опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) являются ключевыми клетками врожденной иммунной системы в микроокружении опухоли при различных типах рака [1]. ОАМ представляют собой высоко гетерогенные клетки, происходящие из резидентных тканеспецифичных макрофагов и вновь рекрутированных моноцитов. Вариабельность ОАМ сильно зависит от типа рака, стадии и внутриопухолевой гетерогенности. Большинство ОАМ запрограммированы микроокружением опухоли на поддержку роста первичной опухоли и метастатического распространения. Однако ОАМ также могут ограничивать рост опухоли и метастазирование [2]. Целью исследования является выявление особенностей секреторного профиля ОАМ наиболее распространенных опухолей, включая рак молочной железы, колоректальный рак, рак яичников, рак простаты и рак легкого.

Материалы и методы. Для исследования были выбраны следующие клеточные линии: MCF-7 (аденокарцинома молочной железы, Lum A подтип), BT-474 (инвазивная протоковая аденокарцинома молочной железы, Lum B подтип), MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы, тройной негативный рак), SKBR-3 (аденокарцинома молочной железы, Her2+ рак), SW-837 (аденокарцинома прямой кишки, 4 стадия, метастатический рак), SKOV-3 (серозная цистаденокарцинома яичника), PC-3

(аденокарцинома простаты) и A-549 (аденокарцинома легкого). Линии клеток в соответствии с рекомендациями культивировались в средах DMEM, RPMI1640, Leibovitz's с 10% FCS и 1% антибиотика до достижения конfluenceности 70–80%. После 3 пассажей собирали супернатанты клеток и замораживали при -80°C .

Для получения модельных макрофагов выделяли моноциты из лейкотромбосля 5 здоровых доноров при помощи магнитной сортировки (MACS) с использованием CD14-позитивной селекции. В качестве контроля макрофаги культивировались в среде X-VIVO (Lonza, Германия) без добавления цитокинов и с добавлением M-CSF (10 нг/мл), IL-4 (10 нг/мл), дексаметазона 10^{-8} М, а также с добавлением 20% среды: DMEM, Leibovitz's и RPMI. Контрольные и экспериментальные моноциты инкубировались в концентрации 1×10^6 клеток/мл при 37°C в течение 6 дней. Супернатант с каждой лунки собирали и центрифугировали при 1600 об/мин в течение 7 минут при 4°C , переносили в другую пробирку и замораживали на -80°C . Методом иммуноферментного анализа определяли концентрации цитокинов, ростовых факторов: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, VEGF. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием критерия Манна-Уитни при $p \leq 0,05$.

Результаты. Анализ уровня секреции IL-6 показал, что добавление опухолевых клеток MDA-MB-231 ($10655,76 \pm 1834,98$), SKBR-3 ($9905,26 \pm 2534,74$), A-549 ($15396,99 \pm 1302,42$) и PC-3 ($9774,39 \pm 2076,55$) приводит к повышению продукции цитокина при сравнении с группой стимулированных макрофагов ($4944,16 \pm 2900,88$; $p \leq 0,05$). Добавление опухолевых клеток линий SKOV-3 ($3327,47 \pm 1168,84$), наоборот, понижало секрецию IL-6 в сравнении с нестимулированными макрофагами ($12547,11 \pm 5921,07$; $p \leq 0,05$).

Повышение продукции IL-1 β было обнаружено при добавление опухолевых супернатантов от клеточных линий MDA-MB-231 ($380,53 \pm 147,17$), SKBR-3 ($362,40 \pm 152,18$), A-549 ($348,75 \pm 105,76$), PC-3 ($361,23 \pm 110,44$) по сравнению со стимулированным контролем ($171,02 \pm 150,88$; $p \leq 0,05$). В случаях MCF-7 ($115,31 \pm 56,32$), SW-837 ($122,92 \pm 45,61$), SKOV-3 ($123,50 \pm 56,91$) происходило снижение уровня IL-1 β по сравнению с нестимулированным контролем ($374,33 \pm 150,88$; $p \leq 0,05$).

Добавление супернатантов от всех опухолевых клеточных линий приводило к повышению уровня секреции IL-10 в 2–7 раз по сравнению с нестимулированным контролем ($102,21 \pm 74,70$; $p \leq 0,05$) и в 4–12 раз по сравнению со стимулированным контролем ($59,13 \pm 47,61$; $p \leq 0,05$) (Рисунок 1).

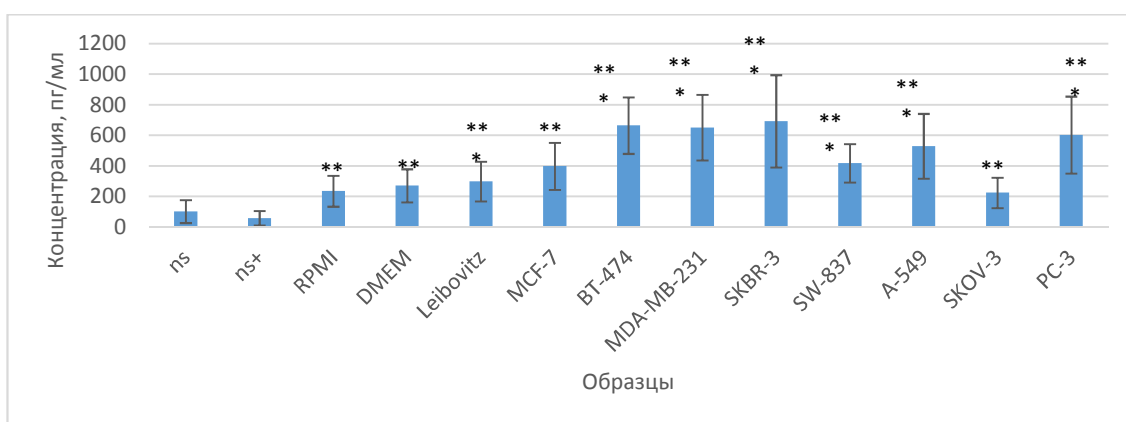


Рис. 1. Средняя концентрация IL-10 в образцах супернатантов опухолевых клеток и макрофагов.

Примечание: * – значимые отличия по критерию Манна-Уитни при сравнении с группой ns ($p \leq 0,05$); ** – значимые отличия по критерию Манна-Уитни при сравнении с группой ns+ ($p \leq 0,05$)

Секреция IL-8 была повышена в макрофагах, инкубируемых с MDA-MB-231 (234127,29±28211,84), SKBR-3 (169869,55±48914,55), A-549 (230726,35±49955,27) и PC-3 (266030,62±76208,51) по сравнению со стимулированным контролем (107992,61±61218,56; $p \leq 0,05$). Напротив, концентрации IL-8 снижались в случаях SKBR-3 (169869,55±48914,55), SW-837 (78659,27±32153,99), SCOV-3 (135640,69±64630,41) при сравнении с нестимулированным контролем (316778,37±114242,82; $p \leq 0,05$).

Секреция IL-18 у макрофагов повышалась при инкубации с клеточными линиями BT-474 (12,05±5,02), SW-837 (15,21±4,88), SCOV-3 (12,74±4,36), PC-3 (12,56±4,22) по сравнению со стимулированным контролем (6,76±1,96; $p \leq 0,05$).

Макрофаги, инкубируемые со всеми клеточными линиями, за исключением PC-3, секретировали в 4–53 раза больше VEGF, чем в стимулированном контроле (148,63±77,60; $p \leq 0,05$) (Рисунок 2).

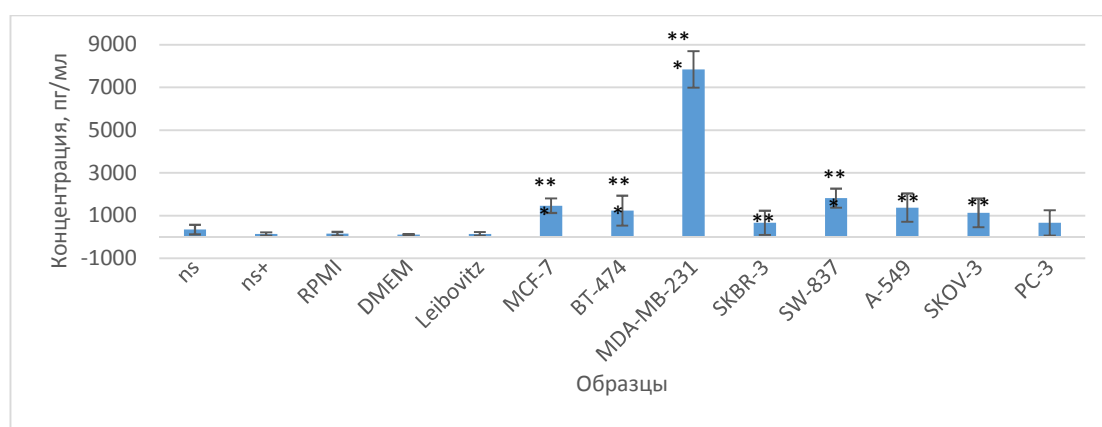


Рис. 2. Средняя концентрация VEGF в образцах супернатантов опухолевых клеток и макрофагов.

Примечание: * – значимые отличия по критерию Манна-Уитни при сравнении с группой ns ($p \leq 0,05$); ** – значимые отличия по критерию Манна-Уитни при сравнении с группой ns+ ($p \leq 0,05$)

Заключение. Таким образом, при стимуляции макрофагов супернатантами от различных опухолевых клеточных линий были выявлены опухоль-специфичные различия в секреторном профиле ОАМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 29.09.2021 № 075-15-2021-1073 на тему: «Генетическое и эпигенетическое редактирование клеток опухоли и микроокружения с целью блокировки метастазирования»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Larionova I. et. all. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers // *Frontiers in oncology*. – 2020. – Vol. 10.
2. Cassetta L., Pollard J.W. Tumor-associated macrophages // *Current biology*. – 2020. – Vol. 30 (6). – P. 246–248.

УДК 615.468.7

СИСТЕМЫ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА

А.В. Тарачев, Д.А. Федоришин

Научный руководитель: профессор, д.ф.-м.н. И.А. Курзина

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

E-mail: alexandrm@list.ru

POLYLACTIDE-BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS

A.V. Tarachev, D.A. Fedorishin

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

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

E-mail: alexandrm@list.ru

***Abstract.** In this work, we developed systems for the local delivery of antibacterial agents to suppress gram-positive and gram-negative microflora in the treatment of infected wounds. As a prototype, films based on polylactide included in their composition of chloramphenicol were used.*

Введение. В настоящее время перспективным материалом для биомедицинских исследований является полилактид. Полилактид имеет долгую историю безопасности для людей и широкий спектр применения. Составы, содержащие полилактид, также были одобрены для многократного применения, что делает полилактид пригодным для ускоренной клинической трансляции. Полилактид широко используется в качестве временных внеклеточных матриц в тканевой инженерии. Применение полилактида в качестве загруженных наночастиц лекарственных средств, таких как липосомы, полимерные наночастицы и дендримеры могут инкапсулировать иные токсичные гидрофобные противоопухолевые препараты и уклоняться от системной токсичности [1]. Использование систем адресной доставки антибактериальных препаратов является наиболее эффективным подходом для лечения инфицированных ран, в связи с этим исследования подобных систем адресной доставки, их строение и свойств, а также поиск новых материалов для них представляются наиболее актуальными. Использование систем адресной доставки антибактериальных препаратов является наиболее эффективным подходом для лечения инфицированных ран, в связи с этим исследования подобных систем адресной доставки, их строение и свойств, а также поиск новых материалов для них представляются наиболее актуальными [2].

Цель исследования является разработка системы локальной доставки антибактериальных средств на основе полилактида для подавления грамположительной и грамотрицательной микрофлоры при лечении инфицированных ран.

Экспериментальная часть. Для получения пленок полилактида с содержанием хлорамфеникола 50 и 100 мг на 1 г полимера (Образец №1 и Образец №2 соответственно, n=6) 1 г полилактида растворяли в 10 мл хлороформа, далее при перемешивании добавляли 1,67 и 3,34 мл 3% спиртового раствора хлорамфеникола соответственно разливали в чашке Петри и высушивали на воздухе. После высыхания

полимерного состава полученная полимерная пленка осторожно отделялась от доньшка плоского сосуда и разрезалась на прямоугольники длиной 20 мм и шириной 10 мм. Затем исследовались физико-механические свойства образцов с помощью разрывной машины *Instron 3347*. Геометрические размеры образцов измерялись с точностью до 0,1 мм. Толщина каждого образца измерялась в трех точках с помощью цифрового микрометра с точностью 0,01 мм. Время растворения материалов определяли, измеряя потерю массы материала после его выдерживания в фосфатном буфере ($pH=7,4$) в течение 15 дней и фиксируя массу после высушивания. Для оценки антибактериальной активности образцов в отношении грамположительной и грамотрицательной микрофлоры использован диско-диффузный метод [3]. В качестве тест-объектов использованы бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Staphylococcus aureus*.

Результаты. В результате испытаний выявлены различия в механических свойствах образцов (Рис.1). Установлено, что образцы с различным содержанием хлорамфеникола имеют схожие характеристики сопротивления растяжению, при этом сила, необходимая для разрыва Образца № 2 больше ($p < 0,05$). Средний модуль Юнга для Образца № 1 составляет 207,93 МПа, тогда как для Образца № 2 – 35,25 МПа соответственно. Поскольку модуль Юнга характеризует способность материала сопротивляться растяжению, можно заключить, что Образец № 1 имеет меньшую способность к деформации, чем Образец № 2. При этом общая деформация до разрыва Образца № 1 составляет 0,05 мм, тогда как Образца № 2 – 0,72 мм ($p < 0,05$).

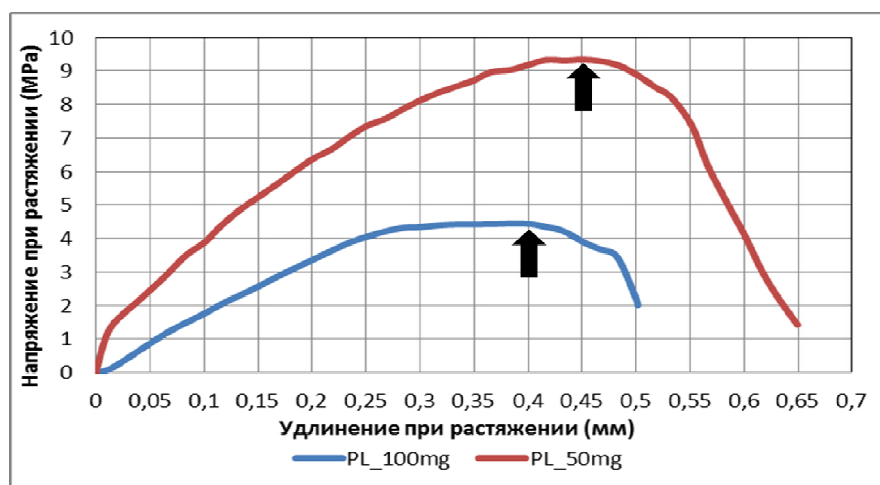


Рис. 1. Механические свойства образцов, содержащих 100 мг (Образец № 1) и 50 мг (Образец № 2) на пленку. Видно большее напряжение и удлинение при растяжении до разрыва у Образца № 2, что показывает его большую механическую прочность ($p < 0,05$)

Исследование изменения массы образцов в процессе гидролиза показало, что первые пять дней растворение материалов протекает с приблизительно одинаковой скоростью, однако, к 10 дню наблюдается увеличение скорости растворения материала ПЛА–ХФ 100 на 4 % относительно материала ПЛА–ХФ 50. Все исследованные образцы проявили значительную антибактериальную активность различной интенсивности в отношении грамположительной и грамотрицательной микрофлоры. Образец со 100 мг хлорамфеникола на пленку оказал большее подавляющее действие, чем образец с 50 мг хлорамфеникола ($p < 0,05$). Поскольку антибактериальная активность образцов обусловлена выходом

хлорамфеникола из них, следует отметить, что подавляющее действие образцов в отношении грамположительной и грамотрицательной микрофлоры различно. Антибактериальная активность образцов в отношении грамположительной микрофлоры оказалась значительно выше, чем для грамотрицательной ($p < 0,05$) (Рис. 2).

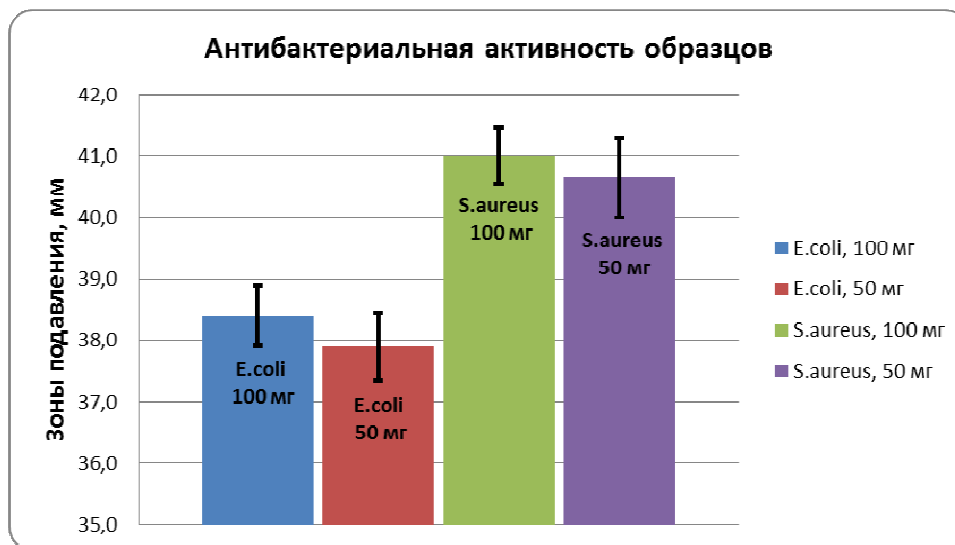


Рис. 2. Антибактериальные свойства образцов с различным содержанием хлорамфеникола (100 и 50 мг на пленку) для грамположительной и грамотрицательной микрофлоры

Заключение. Исходя из проведенных испытаний, можно заключить, что Образец № 2 обладает большей упругостью, эластичностью и прочностью на разрыв, чем Образец № 1. Возможно, это объясняется наличием большего количества кристаллических включений хлорамфеникола в полилактидной матрице Образца № 1. Эти кристаллические включения и служат центрами разрушения при растяжении. Увеличение потери массы при гидролизе очевидно связано с тем, что в первую неделю происходит растворение наружной пленки ПЛА над частицами ХФ, которые являясь растворимыми в воде, начинают более динамично терять массу в результате диффузии воды к частицам. Исходя из этого можно сделать вывод, что увеличение концентрации ХФ приводит так же к увеличению скорости его высвобождения. Исследование антибактериальной активности полученных материалов показало, что образец со 100 мг хлорамфеникола на пленку оказывает более сильное подавляющее действие на бактерии, чем образец с 50 мг хлорамфеникола.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tyler B., Gullotti D., Mangraviti A., Utsuki T., Brem H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications //Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. – Vol. 107. – P. 163–175.
2. Chereddy K.K., Vandermeulen G., Preat V. PLGA based drug delivery systems: promising carriers for wound healing activity // Wound Repair Regen. – 2016. – Vol. 24. – P. 223–236.
3. ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар.

УДК 577.353

**РОЛЬ КАЛЬЦИЯ В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ ОТВЕТОВ ЛЕГОЧНОЙ
АРТЕРИИ В МОДЕЛЯХ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЪЕМА КЛЕТОК**Э.В. Тотумачева, А.В. Киреева, В.С. Гусакова

Научный руководитель: д.м.н. С.В. Гусакова

Сибирский государственный медицинский университет,

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

E-mail: ryd4enkoviknoriva@mail.ru**ROLE OF Ca²⁺ IN REGULATION OF PULMONARY ARTERY CONTRACTILE RESPONSES IN
MODELS OF CELL VOLUME MODULATION**E.V. Totumacheva, A.V. Kireeva, V.S. Gusakova

Scientific Supervisor: Dr. S.V. Gusakova

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

E-mail: ryd4enkoviknoriva@mail.ru

Abstract. *Physiological processes in cells that implement the mechanisms of cell volume regulatory changes are one of the important functions of homeostasis, which determines not only the shape of the cell, but also other cellular functions, such as growth, migration and cell death. The influence of nonisosmotic solutions, blocker of Ca²⁺ channels and calcium-free EGTA-containing solution on vascular segments mechanical tension was studied in isometric regime with organ bath technique performed with the 4-channel Myobath II and software complex LAB-TRAX-4/16 (Germany). Hyperosmotic shrinkage was induced by adding 150 mM sucrose to the Krebs solution, the hypoosmotic environment was created by reducing the concentration of NaCl to 40 mM. It was revealed that contractile activity of the rat pulmonary artery in a hyposmotic medium is mediated by the extracellular calcium intake. The amplitude of hyperosmotically-induced contraction increases in a calcium-free medium. Blocking the voltage-sensitive release of calcium from the sarcoplasmic reticulum increases the amplitude of contraction in all heterosmotic media. When the osmolarity of the hyposmotic incubation medium was restored up to the isosmotic, this followed by the contraction mediated by the entry of extracellular calcium through nifedipine-insensitive calcium channels.*

Введение. Физиологические процессы в клетках, обеспечивающие реализацию механизмов регуляторного изменения объема клеток, являются одной из важных функций гомеостаза, определяющей не только форму клетки, но и другие клеточные функции, такие как рост, миграция и гибель клеток. В предыдущих исследованиях нами было показано, что гетероосмотические среды способны вызывать сократительные ответы сосудистых сегментов. При гипоосмотическом набухании и изоосмотической стрикции клеток сокращения имеют транзиторный характер, а в случае гиперосмотического сжатия развивается поддерживаемый сократительный ответ. Одним из механизмов объем-зависимой регуляции сократительной активности гладких мышц легочной артерии является активация Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ котранспорта и хлорных каналов мембраны гладкомышечных клеток [1]. На сосудах большого круга кровообращения было показано, что сократительные реакции при набухании, но не стрикции, гладкомышечных клеток опосредованы поступлением внеклеточного кальция [2]. Однако, участие ионов

кальция в развитии сокращений, индуцированных изменением объема гладкомышечных клеток легочной артерии, малоизучено. Целью работы было исследовать вклад вне- и внутриклеточных ионов кальция в реализацию объем-зависимой сократительной активности легочной артерии крысы.

Материал и методы исследования. Исследование проводилось на сосудистых сегментах легочной артерии с сохранным эндотелием крыс линии Wistar. Сократительная активность гладкомышечных сегментов исследовалась методом механографии. Объем-зависимая сократительная активность сосудистых сегментов моделировалась путем помещения сегментов в гиперосмотическую (содержащую 120 мМ сахарозы), гипоосмотическую (содержащую сниженную концентрацию NaCl в нормальном растворе Кребса до 40 мМ) среды и путем помещения сегментов в осмоотический раствор Кребса после 60-минутной инкубации в гипоосмотической среде. Для исследования кальциевой проводимости мембраны гладкомышечных клеток использовались модифицированные бескальциевые растворы содержащие 2 мМ ЭГТА, блокатор потенциал-зависимых Ca^{2+} кальциевых каналов нифедипин (0,1 мкМ, предобработка 10 минут). Для исследования вклада кальция, содержащегося в саркоплазматическом ретикулуме, использовали блокатор потенциал-чувствительного высвобождения кальция из саркоплазматического ретикулума тетракаин (10 мкМ, предобработка 30 минут). Амплитуду сократительных ответов рассчитывали в процентах от амплитуды сокращения, вызванного гиперкалиевым раствором Кребса, величину которого принимали за 100%. Данные представлены в виде «Me (Q25;Q75)».

Результаты. Бескальциевый ЭГТА-содержащий раствор готовился путем удаления кальция из среды и добавлением хилатора кальция ЭГТА в концентрации 2 мМ. При помещении сосудистых сегментов в модифицированный бескальциевый ЭГТА-содержащий раствор Кребса на 10 минут с последующей аппликацией бескальциевого ЭГТА-содержащего гиперкалиевого раствора сократительных реакций не наблюдалось. В условиях отсутствия кальция развитие гипоосмотической стрикции не наблюдалось (n=6). При добавлении бескальциевого ЭГТА-содержащего гиперосмотического раствора (120 мМ сахарозы) наблюдался сократительный ответ, амплитуда которого была достоверно выше амплитуды гиперосмотически-индуцированного сокращения в контроле (в среде с кальцием, n=6, p<0,05). Для исследования сократительной активности сосудистых сегментов легочной артерии в условиях осмоотической стрикции при отсутствии кальция в среде сосуды помещали в бескальциевый ЭГТА-содержащий гипоосмотический раствор за 10 минут до смены раствора на бескальциевый ЭГТА-содержащий раствор Кребса. Было получено достоверное снижение амплитуды гипоосмотически-индуцированной сократительной реакции (Табл. 1).

Предобработка нифедипином не приводила к изменению амплитуды сократительного ответа на воздействие гиперосмотической среды, однако снижала амплитуду гипоосмотически-индуцированного сокращения. При действии нифедипина на осмоотически-индуцированное сокращение наблюдалось небольшое, но статистически значимое увеличение амплитуды транзиторной сократительной реакции (Табл. 1).

Блокатор потенциал-чувствительного высвобождения кальция из саркоплазматического ретикулума тетракаин не оказывал значимого влияния на амплитуду гипо- и осмоотически-индуцированных транзиторных сокращений, но значимо увеличивал амплитуду сокращения в гиперосмотическом растворе (Табл. 1).

Таблица 1

Влияние бескальциевых ЭГТА-содержащих растворов и блокаторов кальциевых каналов на гипер-, гипо- и изоосмотически-индуцированные сократительные ответы гладкомышечных сегментов легочной артерии крысы

Тестируемый раствор	Амплитуда, %			
	контроль	бескальциевый ЭГТА-содержащий (2мМ) раствор	нифедипин	тетракаин
Гиперкалиевый (15 KCl)	100	0*	48,8 (44,5;53,2)*	80,8 (74,5; 81,8)*
Гиперосмотический (120 мМ Сахароха)	57,6 (48,1; 64,6)	106,5 (101,5;116,8)*	48,9 (39,8;58,0)	100,6 (99,3;101,9)*
Гипоосмотический (40 мМ NaCl)	72,9 (63,6; 74,4)	0*	52,6 (50,5;54,3)*	77,2 (73,9;82,0)
Изоосмотический	32,3 (31,3;42,4)	15,6 (15,1;20,7)*	42,1 (40,5;46,5)*	36,0 (34,9;35,7)

Примечание: % - от амплитуды сокращения, вызванного 15 мМ KCl

* - $p < 0,05$, статистически значимые отличия от амплитуды сокращения в контроле (n=6).

Выводы. Сократительная активность легочной артерии крысы в гипоосмотической среде опосредована поступлением внеклеточных ионов кальция. Сокращение, вызванное гиперосмотической стрижией, увеличивается в бескальциевой среде. Блокирование потенциал-чувствительного высвобождения кальция из саркоплазматического ретикулума приводит к увеличению амплитуды гиперосмотически-индуцированного сокращения. Восстановление осмолярности среды инкубации после гипоосмотической приводит к сокращению, которое опосредованно поступлением внеклеточного кальция по нифедипин-нечувствительным кальциевым каналам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусакова С. В. и др. Исследование роли Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта в регуляции тонуса легочной артерии // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2020. – Т. 10. – №. 2.
2. Anfinogenova Y.J. et al. Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransport, intracellular Cl^- and L-type Ca^{2+} channels // Pflugers Arch — 2004. – V. 449. – №. 1. – P. 42–55.

УДК 612.111.4

**ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ СКАФФОЛДОВ НИКЕЛИДА ТИТАНА
КУКУРБИТ[6]УРИЛОМ НА ГЕМОЛИТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ**

Д.А. Федоришин, А.Э. Ухов

Научные руководители: профессор, д.х.н. А.А. Бакибаев, к.ф.-м.н. Е.С. Марченко

Национальный исследовательский Томский государственный университет

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

E-mail: strix187@yandex.ru

**EFFECT OF SURFACE MODIFICATION OF TITANIUM NICKELIDE SCAFFOLDS BY
CUCURBIT[6]URIL ON THE HEMOLYTIC EFFECT**

D.A. Fedorishin, A.E. Ukhov

Scientific Supervisors: Prof., Dr. A.A. Bakibaev; Ph.D. E.S. Marchenko

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

E-mail: strix187@yandex.ru

***Abstract.** Currently, materials based on titanium nickelide with shape memory effects (SME) and superelasticity (SE) are developed. However, their biocompatibility is not always sufficient for use in medicine. One way to improve biocompatibility is to modify these materials with nitrogen-containing supramolecular heterocycles. In this study, the cytocompatibility of titanium nickelide scaffolds modified by CB[6] studied by assessing their hemolytic activity. The low hemolytic activity of modified CB[6] samples was shown. The optimal parameters for assessing the hemocompatibility of such samples were established.*

Введение. В настоящее время активно разрабатываются материалы на основе никелида титана. Главным их преимуществом являются эффекты памяти формы (SME) и сверхэластичности (SE) [1].

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

Создание биоподобных материалов – весьма сложная задача. Некоторое время назад открыта группа азотсодержащих соединений, называемых кукурбитурилами. Особенностью данных соединений является их биоподобность, что обеспечивает высокую вовлеченность в естественные биологические процессы, и, как следствие, высокую биосовместимость. Поэтому разработка и исследование биоподобных материалов с применением кукурбитурилов является очень актуальным направлением. Эти молекулы представляют собой макроциклические гексамеры гликолурила с метиленовым мостиком. Полости кукурбитурилов являются гидрофобными, в то время как порталы с карбонильной каймой проявляют дипольные свойства, которые очень привлекательны для катионных гостевых молекул. Внутренние полости демонстрируют сильное связывание с гидрофобными соединениями. Кукурбитурилы представляют собой молодое семейство молекулярных контейнеров, способных образовывать устойчивые комплексы с различными «гостями», включая молекулы лекарств, различные

аминокислоты и пептиды, сахараиды, красители, углеводороды, перфторированные углеводороды и даже высокомолекулярные соединения, такие как белки (например, человеческий инсулин) [2].

При биотестировании материалов, контактирующих с внутренней средой организма, наибольшее внимание уделяется влиянию биоматериала на клетки крови, то есть в первую очередь на реакцию эритроцитов и лейкоцитов. Исследование гемосовместимости перспективных биоматериалов *in vitro* может максимально точно имитировать варианты условий контакта материалов с кровью при их клиническом применении [3].

Целью исследования является оценка гемосовместимости скаффолдов из никелида титана, модифицированных кукурбитурилом (СВ[6]).

Материалы и методика исследования. В данном исследовании использовались образцы, представляющие собой скаффолды из никелида титана, имеющие форму прямоугольного параллелепипеда с длиной стороны 10 мм и высотой 1 мм ($n = 7$). Для их модификации использовалось одно азотсодержащее макроциклическое соединение – кукурбитурил (СВ[6]). СВ[6] - наиболее распространенный представитель кукурбитурилов.

Модификация поверхности представленных на исследование образцов осуществлялась 2 методами – окунанием ($n = 3$) и СВЧ-модификацией ($n = 3$). При окунании образцы окунали в 1 % раствор СВ[6] в физиологическом растворе (0,9 % NaCl в дистиллированной воде) на 15 мин с последующим высушиванием на воздухе при комнатной температуре. СВЧ-нанесение осуществлялось при 50 °C с помощью лабораторной системы для микроволнового синтеза Speedwave four Microwave Digestion Systems (Berghof Products, Germany). Время экспозиции составляло 40 мин при 95 % мощности.

Для оценки гемосовместимости образцов использовалась цельная гемостатированная кровь здорового донора-мужчины. Кровь разводили стерильным раствором 1X PBS с температурой 37 °C в соотношении 1:9. Интактные и модифицированные образцы помещали в стандартный 12-луночный планшет для культивирования клеток и заливали полученным раствором крови в PBS в соотношении 1 мл раствора на 1 см² площади поверхности образца. В качестве положительного контроля использовали деионизированную воду, в качестве отрицательного контроля использовали раствор 1X PBS. Затем планшет инкубировали в термостате при 37 °C в течение 60 мин. После этого кровь из лунок планшета переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин для осаждения оставшихся эритроцитов. Затем осторожно удаляли супернатант и переносили в кювету для спектроскопического анализа при 545 нм и анализировали с помощью ультрафиолетового спектрофотометра Uniplan (Pikon Inc.). Процент гемолиза представляет собой среднее значение трех повторностей и рассчитывается по формуле:

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

Результаты. Установлено, что гемолитический индекс для контрольного образца никелида титана составил $0,5 \pm 0,1$ %, что представляет собой наименьший процент гемолиза в данной выборке (Рис. 1, «Control»). При этом уровни гемолиза образцов никелида титана, модифицированных методами окунания и СВЧ в 2,4 и 2,8 раза соответственно выше, чем уровень гемолиза контрольного образца ($p < 0,05$) (Рис. 1, «Dipping» и «Microwave»). При этом не обнаружено статистически достоверных различий непосредственно между образцами, модифицированными методами окунания и СВЧ ($p > 0,05$).

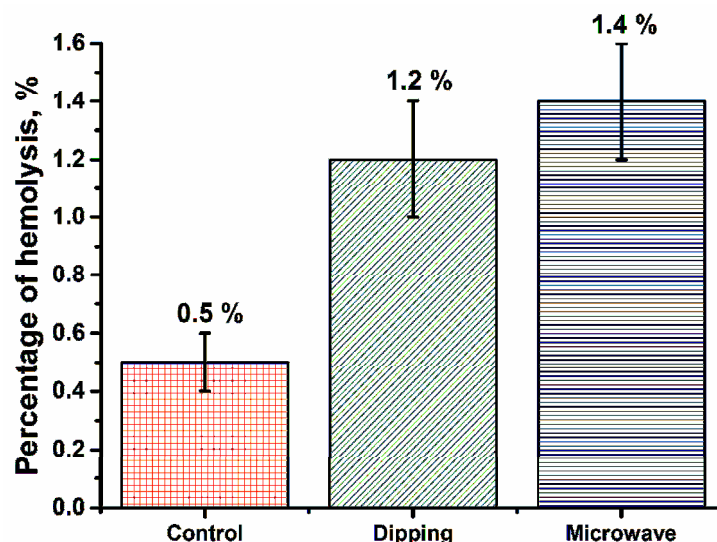


Рис. 1. Процент гемолиза эритроцитов при прямом контакте с модифицированными СВ[6] образцами никелида титана

Заключение. Установлено, что интенсивность окраски надосадочной жидкости в опытных пробах достоверно превышала таковую контрольных проб. Следовательно, модифицированные СВ[6] образцы никелида титана вызывали частичный выход гемоглобина из эритроцитов в надосадочную жидкость. Также выявлено, что степень гемолиза зависит от количества эритроцитов в эритроцитарной взвеси. Наиболее выраженный гемолиз наблюдался при концентрации эритроцитов $1,0 \times 10^6$ тыс/мл. При этом в опытных пробах оптическая плотность надосадочной жидкости была в 2,4 раза выше, чем в контрольной пробе ($p < 0,05$). Поэтому данная концентрация эритроцитов будет использоваться в дальнейших исследованиях.

Апробированный в данной работе способ контроля цитосовместимости успешно проявил себя в качестве достоверного экспрессного метода контроля общей цитотоксичности материалов. Все представленные на исследование образцы никелида титана не превышают допустимых уровней гемолиза для медицинских материалов, контактирующих с кровью согласно ГОСТ ISO 10993-4-2020 [3]. Также показано, что модификация поверхности образцов с помощью СВ[6] обоими использованными методами усиливает гемолитическую активность образцов крайне незначительно, что позволяет использовать это соединение для дальнейших исследований по модификации поверхности и придания материалам биоподобия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kokorev O.V., Khodorenko V.N., Bajgonakova G.A. [et al.]. Metal-Glass-Ceramic Phases on the Surface of Porous TiNi-Based SHS-Material for Carriers of Cells // Russ. Phys. J. – 2019. – Vol. 61. – P. 1734–1738.
2. Das D., Assaf K.I., Nau W.M. Applications of Cucurbiturils in Medicinal Chemistry and Chemical Biology // Front. Chem. – 2019. – Vol. 7. – P. 1–23.
3. ГОСТ ISO 10993-4-2020 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследования изделий, взаимодействующих с кровью – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 39 С.

УДК 617.764.1-008.8

**MORPHOLOGICAL CHANGES IN HARDERIAN GLANDS AFTER THE IMPLANTATION OF
POLYCAPROLACTONE FILMS INTO THE CORNEA**

E.O. Filippova, A.D. Zhuravleva

Scientific Supervisor: Prof., Dr. U.U. Kryuchkov

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

E-mail: katerinabosix@mail.ru

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЖЕЛЕЗ ГАРДЕРА ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ
ПЛЕНОК ПОЛИКАПРОЛАКТОННЫХ В РОГОВИЦУ**

Е.О. Филиппова, А.Д. Журавлева

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

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

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

E-mail: katerinabosix@mail.ru

***Аннотация.** Имплантация пленок поликапролактона в строму роговицы глаза сопровождается развитием незначительных реактивных изменений желез Гардера в виде умеренного полнокровия сосудов, отека стромы железы, которые обуславливают неспецифические реактивные изменения в железе. Реактивные изменения железы Гардера (умеренное полнокровие сосудов, отек стромы железы) свидетельствуют об экзогенном механизме - хирургическом воздействии на морфологическую трансформацию железы.*

Introduction. Polycaprolactone (PCL) is a biodegradable polyester and is widely used in medicine: for tissue engineering, as substrates, microspheres and scaffolds for drug delivery systems, for the production of threads and pins [1]. Of particular interest is the use of PCL as a corneal implant for the bullous keratopathy treatment. The bullous keratopathy is the severe cornea disease and occupies one of the leading positions among the causes of corneal weak vision. Primary and secondary processes of the degenerative and infectious diseases of the cornea play a significant role in the development of bullous keratopathy, which leads to the death of endotheliocytes and dysfunction of the corneal endothelial layer. This contributes to the development of corneal edema, reduced vision, the occurrence of recurrent erosions and pronounced pain symptom.

Implantation of the PCL films for bullous keratopathy is possible in two ways: into the corneal stroma and into the anterior chamber of the eye. At present, the authors of the article have established that the implantation of the PCL films into the cornea or into the eye anterior chamber is accompanied by mild leukocyte infiltration and vasculogenesis in the cornea [2].

In addition, despite the abundance of literary sources on the use of PCL in medicine [3, 4], there is no information regarding the effect of this polymer on morphological changes in Harderian glands (HG) during implantation of the PCL films.

The purpose of this research is to determine the morphological changes in the HG after the implantation of PCL films into the corneal stroma of the eye.

Materials and methods. The feedstock for films was obtained by dissolving PCL with the molecular weight, $M_w = 80,000$ g/mol (Sigma-Aldrich, England) in the chloroform (CHCl_3). 1% solution was poured into Petri dishes (12 g) which were placed in a fume hood until complete evaporation of CHCl_3 and the formation of PCL films.

9 pubescent male *Sylvilagus bachmani* rabbits (SSMU, Tomsk, Russia) weighing 2.5-3.0 kg were used. All animals were healthy and free of ocular diseases. This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Siberian Medical State University Life Science Ethical Review Committee (protocol № 7892 from May 13th, 2019) and conformed to the ARVO guidelines for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Before the experiment, all the animals stayed in vivarium isolation with a regular feeding schedule for one week.

The animals were divided into 2 groups:

The 1st group ($n = 3$) – the intact (control) group.

The 2nd group ($n = 6$) – animals with an implanted PCL film with a diameter of 8.0 mm in layers of the cornea's own substance closer to the Descemet's membrane. Tobrex solution was instilled 3 times per day, 0.1% Diclofenac Sodium Ophthalmic Solution was instilled 3 times per day and 5% Corneregel was placed in the lower eyelid 2 times per day after the operation during 2 weeks.

The overall duration of the experiment comprised 30 days. Such methods as visual check, an optical coherent tomography (OCT) of cornea and photographic registration of the eye were also used in the course of the experiment. Sampling (HG, cornea) was performed on day 30 after the start of the experiment for morphology studying. Biological materials (HG, cornea) were fixed in 10% solution of neutral formalin and were embedded in paraffin according to the generally accepted method. Cross-sections of the HG were stained with hematoxylin and eosin. The counting and photographing of HG cross-sections were carried out at a magnification of 400 times using a Mikmed-6 microscope (LOMO, Russia) and an MPKS digital video camera (LOMO, Russia). The specific volumes (%) of the epithelium and stroma of the HG were calculated using Avtandilov's ocular insert. The epithelial/stromal ratio (ESR) was also calculated. The optical coherent tomography of cornea was carried out on Cirrus HD-OCT 5000 (Germany).

Statistical package IBM SPSS Statistics 20 was used for the statistical processing of the obtained results. Medians (Me) and interquartile range (Q1-Q3) were determined for biological data. Means (m) and standard deviations were determined for physical data. The nonparametric Mann-Whitney test was used to assess the differences. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results. The effect of PCL films implantation on corneal changes was presented in the work [2]. Structural changes in the HG were expressed after the implantation of PCL films into the corneal stroma of the eye. The HG in the 2nd group was characterized by a high density of the secretory acini, between which there was loose connective tissue. The acini were expanded, lined with glandular cells of various shapes (from columnar to squamous). The expanded secretory acini of the HG contained lipid secretions in the lumen. The cytoplasm of the secretory acini had a fine-mesh structure. Cell nuclei were located in the basal regions. Full-blooded vessels and moderately pronounced edema were observed in the stroma of the HG.

The statistics analysis showed that the specific volumes of the epithelium and stroma in the 2nd group significantly differed from the 1st group. Specific volume of the HG epithelium in the 1st group was 44 (42-47)%, in the 2nd group was 42.5 (38.5-45)%. Specific volume of the stroma of the HG epithelium in the 1st

group was 4 (2-7)%, in the 2nd group was 5.5 (4-8.5)%. Analysis of ESR revealed a decrease of ESR in the 2nd group where it was 7.8 ($p < 0,05$). The ESR of the 1st group was 11.

According to the results, the implantation of the PCL films into the corneal stroma of the eye is accompanied by the development of minor reactive changes in the HG, such as moderate vascular congestion, edema of the gland stroma. This is probably due to increased secretion of the HG as indicated by the appearance of flattened forms of glandular cells. Thus, the implantation of PCL films causes nonspecific reactive changes in lacrimal HG to varying degrees of severity. The reactive changes in the HG (moderate vascular congestion, edema of the gland stroma) indicate an exogenous mechanism – a surgical effect on the morphological transformation of the gland.

Conclusion. The implantation of the PCL films into the corneal stroma of the eye is accompanied by the development of minor reactive changes in the HG, such as moderate vascular congestion, edema of the gland stroma, which cause with nonspecific reactive changes in the HG. The reactive changes in the HG (moderate vascular congestion, edema of the gland stroma) indicate an exogenous mechanism – a surgical effect on the morphological transformation of the gland.

The research was conducted with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) as part of the project № 20-08-00648.

REFERENCES

1. Lopes, M.S., Jardim, A.L., Maciel Filho, R. Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications // *Procedia Engineering*. – 2021. V. 42. – P. 1530-1542.
2. Filippova, E. O., Ivanova, N. M. The influence of the plasma modification on properties of PCL films as corneal implants // *AIP Conference Proceedings*. – 2020. – V.2310. – P. 020096.
3. Ershuai, Z., Chuanshun, Z., Jun, Y., Hong, S., Xiaomin, Z., Suhua, L., Yonglan, W., Lu, S., Fanglian, Y. (2016) Electrospun PDLA/PLGA composite membranes for potential application in guided tissue regeneration // *Materials Science and Engineering*. – 2016. – V. 58. – P. 278-285.
4. de la Mata, A., Mateos-Timoneda, M. A., Nieto-Miguel, T., Galindo, S., López-Paniagua, M., Planell, J. A., Engel, E., Calonge, M. Poly-l/dl-lactic acid films functionalized with collagen IV as carrier substrata for corneal epithelial stem cells // *Colloids Surf B Biointerfaces*. – 2019. – V. 177. – P. 121-129.

УДК 617.764.1-008.8

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЖЕЛЁЗ ГАРДЕРА ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ ТРЕКОВЫХ
МЕМБРАН ИЗ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТА В ПЕРЕДНЮЮ КАМЕРУ ГЛАЗА**

Е.О. Филиппова, А.Д. Журавлева

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

Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

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

E-mail: katerinabosix@mail.ru

**MORPHOLOGICAL CHANGES IN HARDER'S GLANDS DURING IMPLANTATION
OF TRACK MEMBRANES FROM POLYETHYLENE TEREPHTHALATE INTO THE
ANTERIOR CHAMBER OF THE EYE**

E.O. Filippova, A.D. Zhuravleva

Scientific Supervisor: Prof., Dr. U.U. Kruchkov

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

E-mail: katerinabosix@mail.ru

***Abstract.** The reactive changes in the Harderian gland revealed during the study (edema of the interlobular stroma, vascular congestion, different types of secretion in the gland) show primarily an exogenous mechanism – the effect of surgery on the morphological transformation of the gland.*

Введение. Трековые мембраны (ТМ) являются мембранами с уникальной структурой, методика получения которых позволяет достичь необходимые транспортные и удерживающие характеристики. Их размер, форму и плотность пор можно изменять контролируемым образом, что позволяет применять мембрану данного типа в различного рода приложениях: в клеточной биологии, системах фильтрации воды, микробиологии, и медицинских целях. ТМ из ПЭТФ имеет высокий потенциал использования в хирургии роговицы, а именно в лечении буллёзной кератопатии – тяжелого, прогрессирующего заболевания, связанного с нарушением эндотелиального слоя роговой оболочки, нарастанием стромального отёка, формированием булл, и, как следствие, стойким снижением зрительных функций, сопровождающимся болевым синдромом и рецидивирующими эрозиями. Исследование влияния ТМ из ПЭТФ на морфологические изменения желёз Гардера при их имплантации в переднюю камеру глаза расширяют фундаментальные знания о данной железе.

Цель исследования – оценить морфологические изменения желёз Гардера при имплантации ТМ из ПЭТФ в переднюю камеру глаза.

Материалы и методы исследования. В работе использованы 10 кроликов породы *Sylvilagus bachmani* массой 2,5-3,0 кг. Эксперименты одобрены локальным Этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (протокол № 3898 от 24.11.2014 г.).

Животные были поделены на следующие группы: 1 группа (n = 5) – интактная группа, которая служила контролем; 2 группа (n = 5) – животные, которым в переднюю камеру глаза осуществляли имплантацию ТМ из ПЭТФ. Для этого производили разрез роговицы с 12 до 3 часов вблизи лимба,

мембрану сложенную валиком имплантировали в переднюю камеру глаза с помощью шпателя, расправляли ее и подшивали узловыми швами нитками 10/00 к роговой оболочке на 11, 4 и 6 часах. Разрез ушивали непрерывным швом нитками 10/00. В послеоперационном периоде закапывали растворы Тобрекса по 1 капле 2 раза в день и закладывали 5% Корнерегеля за нижнее веко по 2 раза в день 2 недели после имплантации материала.

ТМ были получены путём облучения ионами Ag и последующего травления в 1,0М NaOH плёнок ПЭТФ. Стерилизация ТМ осуществлялась с использованием γ -установки «Исследователь №52» с источником радионуклида ^{60}Co (НИИ ПП, Томск) дозой 15 кГр (Si-детектор).

В ходе эксперимента животным проводили наружный осмотр и фоторегистрацию визуальных изменений. Выведенным из эксперимента животным на 30-е сутки от начала эксперимента (после имплантации ТМ второй группе животных) выполняли энуклеацию с одновременным выделением желёз Гардера (ЖГ). Для микроскопического исследования биологический материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и заливали в парафин по общепринятой методике. Полученные срезы, толщиной 5-6 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Подсчёт и фотографирование микропрепаратов осуществляли при увеличении в 400 раз, с использованием микроскопа Микмед-6 (ЛОМО, Россия) и цифровой видеокамеры МПКС (ЛОМО, Россия). При помощи окулярной вставки Автандилова подсчитывали удельные объёмы (%) эпителия и стромы ЖГ, вычисляли эпителио-стромальное соотношение (ЭСС).

Для статистического анализа полученных результатов исследований применялся статистический пакет IBM SPSS Statistics 20 с вычислением медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q1-Q3). Для оценки различий использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Морфологическая картина ЖГ при имплантации ТМ в переднюю камеру глаза характеризовалась компактным расположением концевых отделов, между которыми находились тонкие прослойки рыхлой соединительной ткани. В экспериментальной группе большая часть ацинусов содержали glanduloциты высокопризматической формы, при этом их апикальные части практически полностью закрывали просвет ацинуса. Остальные клетки имели кубическую форму, у части клеток наблюдалось отделение апикальной части цитоплазмы в просвет, что свидетельствовало в пользу апокринового типа секреции. В междольковой строме наблюдался неравномерно выраженный отёк и выраженное полнокровие сосудов.

Статистический анализ структурных компонентов ЖГ показал, что удельные объёмы эпителия у животных 2-ой группы статистически значимо уменьшались, а удельные объёмы стромы напротив – не отличались от таковых по сравнению с показателями в 1-ой группе. ЭСС во 2-ой группе характеризовалось снижением и составило 8,6, в 1-ой группе – 11; $p < 0,05$.

Известно, что на активность ЖГ влияют как эндогенные факторы (пролактин, гормоны щитовидной железы, стероидные гормоны), так и экзогенные факторы (свет, температура). Так, например, гормоны щитовидной железы способствуют скоплению секрета ацинусов ЖГ с преобладанием в клетках плотных базофильных секреторных гранул. Как показали результаты работы [1], нейроэндокринно- тиреоидная связь, играет ключевую роль в сохранении структурной целостности и секреторной активности ЖГ. При воздействии радиоактивным йодом на железу в ней происходят фиброз, изменения формы ядер и

вакуолизация клеток [2]. При изучении влияния мелатонина на ЖГ у животных, которые получали липополисахариды, было установлено, что железа при данной диете имела достаточно серьёзные морфологические трансформации: нарушение структурной организации, вакуолизация цитоплазмы, лимфоклеточная инфильтрация, а в просвете ацинусов прослеживались клеточные фрагменты [3]. В работе [4], посвящённой изучению железы при индуцированном аутоиммунном диабете, были установлены схожие морфологические изменения, как и в предыдущем исследовании.

Экзогенный механизм, например, при инвазивных процессах, способствует сильному окислительному стрессу в ЖГ с выделением активных форм кислорода, вследствие чего появляются различной степени выраженности неспецифические реактивные изменения в ЖГ. Так, воздействие непрерывного флуоресцентного освещения на животных в течении 2-х дней способствовало разрушению концевых отделов, появлению лейкоцитарной инфильтрации, а также деформации клеточных ядер, формированию секреторных клеток с жировыми каплями в ЖГ [5].

Таким образом, выявленные в ходе исследования реактивные изменения в ЖГ (отёк междольковой стромы, полнокровие сосудов, различный тип секреции в железе) свидетельствуют в первую очередь об экзогенном механизме – хирургическом влиянии на морфологическую трансформацию железы.

Заключение. Реактивные изменения в ЖГ, выраженные в виде отёка междольковой стромы, полнокровия сосудов, различного типа секреции в железе, свидетельствуют об экзогенном механизме – хирургическом влиянии на морфологическую трансформацию железы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-08-00648.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Santillo A., Burrone L., Falvo S., Senese R., Lanni A., Chieffi Baccari G. Triiodothyronine induces lipid oxidation and mitochondrial biogenesis in rat Harderian gland // Journal of Endocrinology. – 2013. – V219 (1). – P. 69–78.
2. Gökhan Koca Icon, Evin Singar, Aylin Akbulut Icon, Nuray Yazihan Icon, Nihat Yumuşak et al. The Effect of Resveratrol on Radioiodine Therapy-Associated Lacrimal Gland Damage // Current Eye Research. – 2021. – V. 46. – P. 398–407.
3. Adrián Santos-Ledo, Beatriz de Luxán-Delgado, Beatriz Caballero, Yaiza Potes, Susana Rodríguez-González, et al. Melatonin Ameliorates Autophagy Impairment in a Metabolic Syndrome Model // Antioxidants. – 2021. – V.10 (796). – P. 1–11.
4. Shahnawaz Imam, Raya B. Elagin, Juan Carlos Jaime Diabetes-Associated Dry Eye Syndrome in a New Humanized Transgenic Model of Type 1 Diabetes // Molecular Vision. – 2013. – V.19. – P. 1259–1267.
5. Zhe Wang, Jin-Hui Xu, Jun-JieMou, Xiao-Tong Kong, Ming Wu et al. Photoperiod Affects Harderian Gland Morphology and Secretion in Female Cricetusbarabensis: Autophagy, Apoptosis, and Mitochondria // Frontiers in Physiology. – 2020. – V. 6 (11). – P. 408.

УДК 57.042

**ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ПЛАЗМЕННЫХ СТРУЙ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**А.А. Фролова^{1,2}, В.О. Нехорошев³

Научный руководитель: к.б.н. М.А. Булдаков

¹Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр РАН,

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

²Национальный исследовательский Томский государственный университет,

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

³Институт сильноточной электроники СО РАН,

Россия, г. Томск, пр. Академический, 2/3, 634055

E-mail: frolova_aa@onco.tnime.ru**THE EFFECT OF LOW-TEMPERATURE PLASMA JETS ON THE VIABILITY OF TUMOR
CELLS**A.A. Frolova^{1,2}, V.O. Nekhoroshev³

Scientific Supervisor: PhD M.A. Buldakov

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, RAS, Tomsk, Russia, Kooperativny str.,
5, 634009²Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050³Institute of High Current Electronics SB RAS, Russia, Tomsk, Akademicheskyy av., 2/3, 634055E-mail: frolova_aa@onco.tnime.ru

Abstract. In the present study, the effect of low-temperature plasma jets on the proliferation of tumor cells was evaluated. The growth of tumor cells of cervical cancer and prostate cancer was reduced to 80% 24 hours after plasma treatment. It was found that 5 minutes after plasma exposure, the level of intracellular ROS doubled, which led to apoptotic cell death. The data obtained indicate the prospects of using low-temperature plasma jets in cancer therapy.

Введение. Рак является ведущей причиной смерти во всем мире, на его долю приходится почти 10 миллионов смертей в 2020 году. Поиск новых методов терапии онкологических заболеваний является актуальной задачей. В настоящее время активно изучается возможность применения низкотемпературной плазмы в терапии рака. Низкотемпературная плазма атмосферного давления может генерировать в избытке активные формы кислорода и азота (АФК и АФА), благодаря которым ее используют для стерилизации, обработки ран, свертываемости крови и т.д [1]. Типичная плазменная струя производит АФК и АФА, такие как гидроксильный радикал, супероксидный анион, перекись водорода и оксид азота. Некоторые из этих химических соединений обладают способностью взаимодействовать с органическими молекулами или являются вторичными посредниками, регулирующими запуск каскада цепных реакций, вызывающих гибель клеток. Для развития и роста

опухолевых клеток крайне важен окислительно-восстановительный потенциал, поскольку для нормальной жизнедеятельности их внутриклеточные уровни АФК должны быть повышены [2]. Однако, повышение исходного уровня внутриклеточных АФК могут вызывать запрограммированную гибель клеток и связаны с подавлением рака.

Одно из основных механизмов действия плазмы заключается в многократном увеличении уровня внутриклеточных АФК, которому опухолевые клетки не способны сопротивляться, в отличие от нормальных клеток. Таким образом, низкотемпературная плазма способна избирательно подавлять рост только опухолевых клеток при отсутствии негативного влияния на нормальные клетки. Следовательно, цель настоящей работы заключалась в изучении влияния действия низкотемпературных плазменных струй на жизнеспособность опухолевых клеток.

Экспериментальная часть. В качестве источника плазмы была использована установка, созданная в ИСЭ СО РАН, для которой характерно отсутствие электромагнитных полей, ультрафиолетового излучения и нагрева на выходе из системы. В качестве объекта исследования были использованы следующие линии опухолевых клеток – HeLa (рака шейки матки) и РС-3 (рака простаты). Плазменная обработка клеток производилась в ранее подобранных режимах воздействия [3] с частотой следования импульсов напряжения 2 кГц и временем экспозиции 120 с. За 24 часа перед плазменной обработкой клетки были посажены в чашки Петри и культивировались в стандартных условиях.

Для оценки жизнеспособности клеток использовался метод МТТ-теста. Результаты анализа были получены на спектрофотометре при длине волны 620 нм через 1, 5 и 7 суток после воздействия плазмы. Детекция апоптоза в опухолевых клетках осуществлялась с помощью набора на Аннексин V (ThermoFisher). Анализ проводился с использованием проточного цитофлюориметра через 24 часа после плазменной обработки клеток. Оценка наличия внутриклеточных АФК проводилась с помощью набора на АФК (Invitrogen) с использованием проточного цитофлюориметра через 5, 30 и 60 минут после обработки клеток.

Результаты. Обработка плазменными струями атмосферного давления опухолевых клеток приводит к ингибированию их пролиферативной активности. Снижение клеточной пролиферации в опухолевых клетках HeLa достигало 75% по сравнению с группой контроля, максимальное значение данного показателя было отмечено на 5-е сутки после воздействия и составляло 80%. Снижение пролиферации опухолевых клеток РС-3 также было максимальным на 5-е сутки после плазменной обработки, значение индекса ингибирования достигало 75%.

При оценке типа клеточной гибели было обнаружено, что процент клеток с признаками апоптоза достигал 80% и 75% для HeLa и РС-3 соответственно (Рис. 1). Процентное соотношение некротических клеток не превышало 15%.

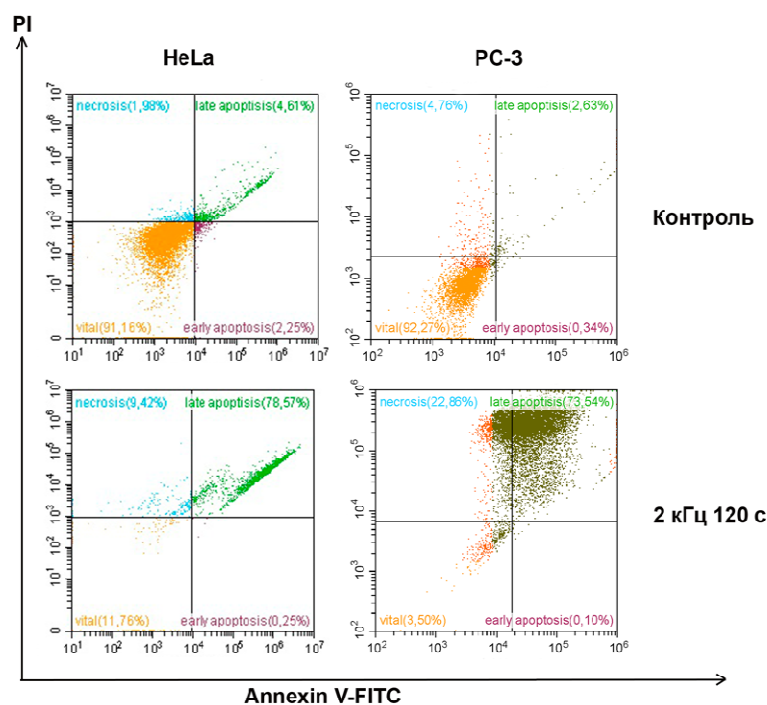


Рис. 1. Процент апоптотических и некротических клеток HeLa, PC-3 через 24 часа после обработки низкотемпературной плазмой, подсчитанный методом проточной цитометрии

Для определения механизма действия низкотемпературных плазменных струй проводился анализ уровня внутриклеточных АФК в опухолевых клетках. Было обнаружено, что после воздействия низкотемпературными плазменными струями в исследуемых опухолевых клетках наблюдается существенное увеличение уровня АФК.

Заключение. В результате проведенных исследований было показано, что низкотемпературная плазма способна подавлять рост опухолевых клеток рака шейки матки и рака простаты до 80%, а также существенно повышать уровень внутриклеточных АФК и запускать запрограммированную клеточную гибель. Вышеприведенные данные свидетельствуют перспективности применения низкотемпературных плазменных струй в качестве противоопухолевого агента, поскольку влияет на рост и развитие опухолевых клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта УМНИК №16126ГУ/2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Keidar M., Walk R., Shashurin A. [et al.] Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy // British journal of cancer. – 2011. – Vol. 105, №9. – P. 1295-1301.
2. Leone A., Roca M.S., Ciardiello C. [et al.] Oxidative stress gene expression profile correlates with cancer patient poor prognosis: identification of crucial pathways might select novel therapeutic approaches // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2017. – Vol. 2017 (2597581). – P. 1-18.
3. Евтина А.А., Булдаков М.А, Нехорошев В.О. [и др.] Влияние низкотемпературных плазменных струй на пролиферацию опухолевых клеток // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2021. – Т. 6, № 3. – С. 464-471.

УДК 616.33-006.6-033.2:575.113

МЕЖСАЙТОВАЯ ЭКСПРЕССИОННАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

И.А. Цыденова, В.А. Маркович, М.К. Ибрагимова

Научный руководитель: к.б.н., М.М. Цыганов

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр РАН

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

E-mail: tsydenova422@gmail.com

INTERSITE EXPRESSION HETEROGENEITY IN PATIENTS WITH GASTRIC CANCER

I.A. Tsydenova, V.A. Markovich, M.M. Tsyganov, M.K. Ibragimova

Scientific Supervisor: Ph.D. M.M. Tsyganov

Cancer research institute of Tomsk National Research Medical Center, RAS, Russia, Tomsk, Kooperativny str.,
5, 634009

E-mail: tsydenova422@gmail.com

Abstract. Gastric cancer (GC) remains one of the most malignant types of cancer due to its rapid progression, distant metastases, and resistance to conventional chemotherapy. Overall, objective response rates to chemotherapy range from 20% to 40%, indicating variable clinical responses likely due to underlying biological heterogeneity. One of the reasons explaining the poor clinical results of therapy is the highly heterogeneous nature of this disease. Tumor heterogeneity in gastric cancer has been proposed as a major barrier to the development of new targeted therapeutics. At the same time, in addition to the well-known intratumoral heterogeneity, metastatic tumors are characterized by heterogeneity between the primary tumor and metastases (lymphogenic and distant). This type of heterogeneity comes to the fore in the treatment of primary metastatic forms of the tumor and is an important reason for the low efficiency of their treatment, since even with a personalized approach it is quite difficult to choose a therapy regimen that would be effective for the treatment of the primary tumor and metastases. For the study, the surgical material (tumor tissue of the stomach, unchanged stomach tissue, carcinomatosis, material of metastasis to the lymph node) of 41 patients with stage IV disseminated gastric cancer with peritoneal carcinomatosis was used. It was found that the level of expression of the studied genes varies greatly. For the ABC transporter genes, the highest expression value is typical for the ABCG1, ABCC2, and ABCG2 genes. Overexpression among chemosensitivity genes at all three points was typical only for Top2A.

Введение. Рак желудка (РЖ) является одним из наиболее злокачественных типов рака из-за его быстрого прогрессирования, отдаленных метастазов и устойчивости к традиционной химиотерапии. На сегодняшний день в качестве основного метода лечения больных местно-распространенным и диссеминированным РЖ рассматривается системная химиотерапия. Частота объективного ответа на лечение не превышает 14 – 25%, а медиана выживаемости пациентов составляет 8 – 10 месяцев [1]. Одной из причин, объясняющих плохие клинические результаты терапии, является крайне неоднородная природа этого заболевания. Для метастатических опухолей характерна гетерогенность между первичной

опухолью и метастазами (лимфогенными и отдаленными). Этот тип гетерогенности выходит на первый план при лечении первично-метастатических форм опухоли и является важной причиной низкой эффективности их лечения. Предыдущие исследования показали, что определенные опухолевые клетки в больших образцах гетерогенных опухолей являются предшественниками отдаленных метастазов. Таким образом, существует множество биологических различий между опухолевыми клетками в первичных и метастатических поражениях [2].

Целью данного исследования явилась оценка экспрессионной гетерогенности генов ABC-транспортёров и генов химиочувствительности в опухоли желудка, канцероматозе и метастазах в лимфатические узлы.

Материалы и методы. В исследование включены 41 больной с диссеминированным РЖ IV стадий с канцероматозом брюшины. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской Декларацией 1964 г. (исправленной в 2013 г.) и с разрешения локального этического комитета института, все пациенты подписали информированное согласие на исследование. Всем пациентам проведена операция в объеме паллиативной гастрэктомия по РУ. После хирургического вмешательства в зависимости от показаний больным проводилась химиотерапия по схемам: GemCap+C; FOLFIRI+C; XELIRI+C; PC. Химиотерапия проводилась при удовлетворительном общем состоянии и лабораторных показателях пациентов без отклонений от нормы. Для исследования был использован операционный материал (опухолевая ткань желудка, неизменная ткань желудка, канцероматоз, материал метастаза в лимфатический узел). РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. На спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) оценивали концентрацию и чистоту выделения РНК. Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Fermentas, Lithuania) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору. Уровень экспрессии генов ABC-транспортёров: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* и генов химиочувствительности: *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* оценивали при помощи обратнo-транскрипционной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) по технологии TaqMan на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Australia). В качестве генов-реферов использовались два гена: *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase) и *ACTB* (actin beta), уровень экспрессии генов нормализовался по отношению к экспрессии генов-реферов и экспрессии в нормальной ткани желудка каждого пациента по методу Pfaffl. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 8.0».

Результаты. В результате проведенного исследования был проанализирован уровень экспрессии шести генов ABC-транспортёров (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2*) и 8 генов химиочувствительности (*BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1*) в трех сайтах на каждого пациента: опухолевая ткань желудка, канцероматоз, метастаз в лимфатический узел. Уровень экспрессии исследуемых генов сильно варьирует. Так, для генов ABC-транспортёров наибольшее значение экспрессии характерно для генов *ABCG1* (3,09±1,09; max. 32,00), *ABCC2* (7,95±2,29; max. 54,11), *ABCG2* (9,63±3,77; max. 100,95), соответственно для опухолевой ткани желудка, канцероматоза и метастаза в л/у. Гиперэкспрессия среди генов химиочувствительности во всех трех точках была характерна только для *Top2A* (17,21±5,99, max. 161,93; 10,85±4,07, max. 105,15; 35,27±0,83, max. 439,62,

соответственно). Сравнение экспрессии между исследуемыми точками материала на каждого пациента показали статистически значимые различия в уровне экспрессии таких генов как: *ABCC1*, *Top2A* и *BRCA1* (рис. 1).

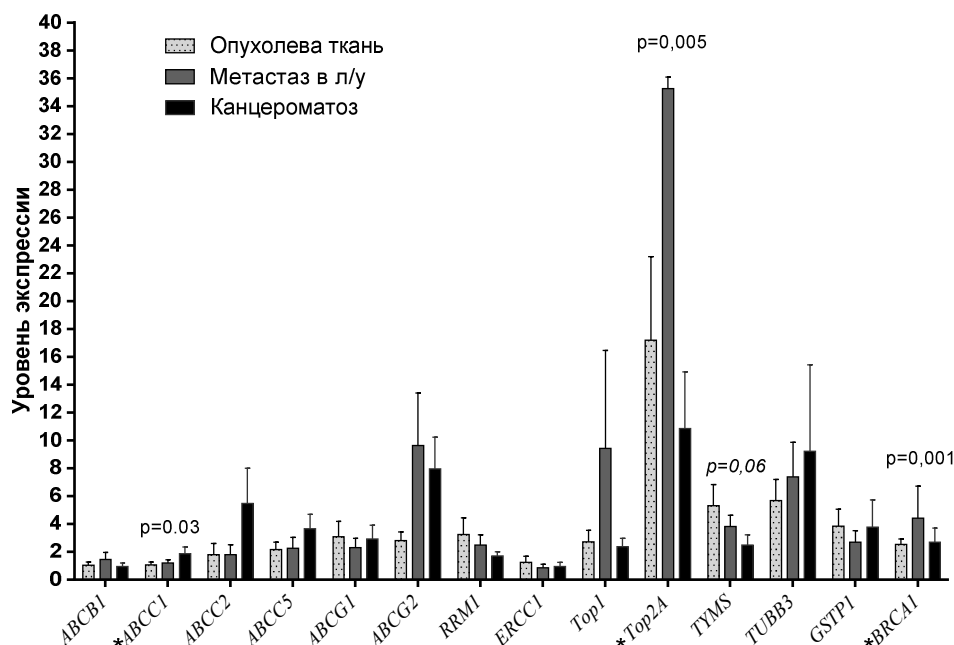


Рис. 1. Сравнение уровня экспрессии исследуемых генов

В частности установлено, что уровень экспрессии генов *Top2A* и *BRCA1* выше в метастазе в лимфатическом узле, по сравнению с опухолевой тканью желудка и канцероматозом (при $p=0,005$ и $p=0,001$). Тогда как экспрессия гена *ABCC1* статистически значимо выше в канцероматозе ($p=0,03$).

Заключение. Из полученных результатов следует, что при раке желудка наблюдается высокий уровень экспрессионной гетерогенности, которая при разных локализациях влияет на паттерны экспрессии различных генов. При этом профиль экспрессии может быть использован для определения уровня гетерогенности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маркович В.А., Тузиков С.А., Родионов Е.О., Литвяков Н.В., Попова Н.О., Цыганов М.М., Левонян Л.В., Миллер С.В., Подолько Д.В., Цыденова И.А., Ибрагимова М.К. Рак желудка: современные подходы и перспективы лечения при канцероматозе брюшины (литературный обзор) // Сибирский онкологический журнал. – 2021. – Т. 6., № 20. – С. 104-113.
2. Naruke A., Azuma M., Takeuchi A. Comparison of site-specific gene expression levels in primary tumors and synchronous lymph node metastases in advanced gastric cancer // Gastric Cancer. – 2015. – V. 18. – P. 262–270.

Научное издание

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

Сборник научных трудов
XIX 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