



ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

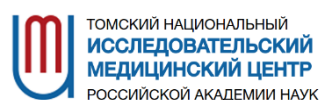
Том 4. Биология и фундаментальная медицина

Сборник научных трудов
XXI Международной конференции студентов, аспирантов
и молодых ученых
23–26 апреля 2024 г.

PROSPECTS OF FUNDAMENTAL SCIENCES DEVELOPMENT

Volume 4. Biology and fundamental medicine

Abstracts
XXI International Conference of students, graduate students
and young scientists
April 23–26, 2024



Томск 2024

УДК 501:004(063)
ББК 72:32.81л0
П27

П27 **Перспективы развития фундаментальных наук** : сборник трудов XXI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Томск, 23–26 апреля 2024 г.) : в 7 томах. Том 4. Биология и фундаментальная медицина / под ред. И.А. Курзиной, Г.А. Вороновой. – Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2024. – 165 с.

ISBN 978-5-4387-1183-4 (т. 4)
ISBN 978-5-4387-1179-7

Сборник содержит труды участников XXI 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.

978-5-4387-1183-4 (т. 4)
978-5-4387-1179-7

© ФГАОУ ВО НИ ТПУ, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

The spectrum of genetic variants in KISS1, GPR54, DLK1 and MKRN3 genes in precocious puberty <i>M.B. Kankanam Patiranjana, O.Yu. Vasilyeva</i>	6
Разработка технологии инкапсулирования экстракта шалфея <i>Salviae Folia</i> <i>Г.И. Абдракова</i>	9
Анальгетическое и психотропное действие нового антагониста рецепторов брадикинина <i>А.Е. Алифоренко, В.В. Быков</i>	12
Роль полиморфизмов гена дофамина рецептора (rs6277 и rs1800497 DRD2) в развитии интернет-зависимости у славян и тувинцев <i>К.В. Афоницева</i>	15
Использование биоиндикационных индексов для анализа экологического состояния малых рек степной части Южного Урала <i>М.В. Бардуков</i>	18
Продукция H₂S в клетках жировой ткани крыс при метаболическом синдроме <i>Ю.Г. Бирулина, Е.Е. Буйко, А.В. Григорьева</i>	21
Полиморфизмы генов протеинкиназных сигнальных путей у больных шизофренией <i>А.С. Бойко, Д.Р. Биктимиров, Д.А. Петкун</i>	25
Особенности фосфатаз DUSP1 и DUSP2 в иммунных клетках крови в динамике проведения НАХТ у больных раком молочной железы <i>А.А. Будницкая, А.А. Фролова, П.С. Ямщиков</i>	28
Выделение и поддержание культуры <i>Rhodomonas</i> sp. <i>И.Д. Волобуев</i>	31
Исследование спектральных характеристик выдыхаемого воздуха пациентов с депрессией с помощью анализа соответствующих спектров поглощения <i>А.П. Вотинцев</i>	34
Роль энтоза в росте и прогрессировании опухоли <i>К.А. Гаптулбарова, И.А. Цыденова, Е.А. Кравцова</i>	37
Анальгетическая активность производного 2Н-хромена на модели нейропатической боли у мышей <i>Н.В. Гуркин, В.В. Быков, И.В. Ильина</i>	40
Генетически модифицированная клеточная линия с гиперэкспрессией гена MYC <i>Д.С. Долгашева, Е.В. Сухинина, Е.А. Кравцова</i>	43
Противоопухолевая активность магнитных наночастиц на основе оксида железа с нанесенным на поверхность доксорубицином <i>Л.В. Ефимова, А.А. Сёмчина, К.В. Невская</i>	46
Неоплазия холангиоцитов при экспериментальном описторхозе: роль окислительных повреждений <i>О.Г. Запарина, А.В. Ковнер</i>	49
Оценка связи полиморфизмов генов WNT-сигналинга с частотой цитогенетических нарушений при действии ионизирующего излучения <i>Д.С. Исубакова</i>	52
Влияние химиотерапии на распределение субпопуляций опухолевых клеток при раке яичников <i>А.Д. Казакова, И.В. Ларионова, А.М. Яцковский</i>	55
Влияние эндогенных опиоидных пептидов на постшемическую сократительную функцию левого желудочка крыс при адаптации к непрерывной хронической нормобарической гипоксии <i>А.С. Кан, И.А. Деркачев</i>	58
Активация ангиогенеза в печени на модели хронического описторхоза и на клиническом материале <i>Я.К. Капуцак, А.В. Ковнер</i>	61
Стресс-индуцированное повреждение сердца: параметры воспаления и сократимости миокарда <i>М. Килин, Б.К. Курбатов</i>	64
Ранозаживляющий потенциал экскреторно-секреторного продукта <i>Opisthorchis felinus</i> на модели сахарного диабета 2 типа <i>А.В. Ковнер, Я.К. Капуцак, О. Запарина</i>	67
Состав микробиоты кишечника при холангиокарциноме: пилотные данные <i>А.Е. Ковширина, Т.С. Соколова, В.В. Куленич</i>	70

Неспецифическое выявление IgG антител к антигенам SARS-CoV-2 и вирусу гриппа при термоинактивации сывороток крови человека и животных <i>А.Д. Костромитина, В.А. Матюшенко, А.Я. Рак</i>	73
Влияние изменения экспрессии и aberrаций числа копий ДНК в генах системы гомологичной рекомбинации на отдаленные результаты лечения больных первично-операбельным раком легкого <i>Е.А. Кравцова, И.А. Цыденова, М.К. Ибрагимова</i>	76
Нейропротекторные свойства артемизинина in vitro <i>В.С. Крышкова, С.А. Пухов, М.С. Кухарский</i>	79
Пространственно-временные характеристики ЭЭГ в процессе решения невербальных задач в контроле и при действии одорантов <i>Ю.Л. Кундупьян</i>	82
Особенности параметров ЭКГ у крыс при диет-индуцированном метаболическом синдроме на фоне адаптации к гипоксии <i>В.Р. Латонов, И.А. Деркачев</i>	85
Профиль микроРНК внеклеточных везикул трематоды <i>Opisthorchis felinus</i> <i>Е.А. Лишай, Е.В. Медведева</i>	88
Уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 коррелирует в ворсинках хориона спонтанных абортусов из одних и тех же семей <i>И.В. Лушников, В.В. Деменева</i>	91
Полиморфизм rs7044343 гена IL33 как прогностический маркер развития бронхолегочных и онкологических заболеваний в популяциях Арктики <i>И.В. Марченко</i>	94
Полиморфный вариант rs1800566 гена NQO1: ассоциации с компонентами метаболического синдрома у больных шизофренией <i>И.А. Меднова, И.В. Пожидаев, Е.В. Михалицкая</i>	97
Влияние почвенной засухи на фотохимическую активность фотосистемы II семядолей растений рапса <i>Д.С. Мельник</i>	100
Потенциал накопления отдельных нутриентов в биомассе модельных видов беспозвоночных <i>М.Д. Морозова, В.П. Модяева, К.Е. Скрипцова</i>	103
Фенотипирование макрофагов человека THP-1 под действием трематоды <i>Opisthorchis felinus</i> <i>Д.В. Пономарев, О. Запарина, Е.А. Лишай</i>	106
A First Look at the Chemical Composition of Thromboaspirate in Myocardial Infarction Patients Through Mass Spectrometry <i>N.A. Poponina, K.I. Kazantseva, V.S. Sidelnikov, A.E. Gombozhapova, E.E. Ivanyuk</i>	109
Влияние расположения ABD на таргетные свойства нового бивалентного терапевтического конъюгата на основе DARPin G3 <i>А.А. Прач, В.В. Боденко, А.С. Фоминых</i>	112
Эффект повышенного уровня длинной некодирующей РНК NEAT1_1 на клеточный стресс в первичных нейрональных культурах <i>Н.Е. Пукаева, В.Н. Залевская, Р.К. Овчинников</i>	115
Модификация пористой керамики для улучшения адгезии клеток <i>Е.И. Сенькина, А.С. Буяков</i>	118
Кардиопротекторный эффект агонистов каннабиноидных рецепторов при реперфузии сердца <i>М. Сиротина</i>	121
Влияние полисахаридсодержащего комплекса из корней лопуха войлочного (<i>Arctium tomentosum</i> Mill.) на развитие карциномы легких Льюис у мышей-самок линии C57Bl/6 <i>Л.А. Соколова, О.Ю. Рыбалкина, Л.В. Жалнина</i>	124
Эффективность антиоксидантов разных типов в экспериментальной модели ДНК-повреждений клеток тестикулярной ткани <i>Л.А. Стремлина</i>	127
Study of antioxidant activity of the <i>Rosa acicularis</i> <i>E.V. Tomtosova, E.K. Romyantsev</i>	130
Исследование вариации газообмена легких под действием ОПА-аэрозоля методами оптико-акустической спектроскопии и ИИ <i>И.А. Тримасов</i>	133

Влияние модификации поверхности гидроксипатита бамбус[6]урилом на гемолитический эффект <i>У.В. Турнаева, Д.А. Федоришин, А.Э. Ухов</i>	136
Перспективы применения нового препарата на основе гиалуронидазы при экспериментальном токсическом циррозе печени у возрастных крыс <i>И.А. Узянбаев, Э.А. Ахтямова, Л.В. Когай</i>	139
Уровень внутриклеточных липидов в мононуклеарах периферической крови при сахарном диабете 1 типа <i>А.А. Уфандеев, Е.Е. Буйко, Л.В. Ефимова</i>	142
Роль уровня экспрессии генов химиочувствительности и генов ABC-транспортёров в назначении персонализированного лечения больным раком желудка IV стадии <i>И.А. Цыденова, Д.С. Долгашева, К.А. Гаптулбарова</i>	145
Сравнительное исследование влияния генно-модифицированных каллусных клеток моркови, содержащих рекомбинантную щелочную фосфатазу человека, и пробиотика лебенина на восстановление количества лактобактерий при экспериментальном дисбактериозе <i>Ю.В. Чекусова, В.В. Быков, Н.В. Гуркин</i>	148
Оценка концентрации лептина у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, осложненной метаболическим синдромом <i>Н.А. Чернышов, Д.А. Прокопич</i>	151
Влияние воздействия наночастиц оксида цинка на энергию прорастания и всхожесть семян <i>Sinapis alba</i> <i>В.Р. Чжоу, Л.Ю. Иванова, О.В. Бакина</i>	154
Разработка комплексного протокола молекулярно-генетических исследований SARS-CoV-2 содержащих образцов <i>А.К. Чистякова, Е.А. Степанова</i>	157
Влияние хронической внутриутробной алкоголизации и хронической внутриутробной гипоксии на морфометрические показатели сосудов микроциркуляторного русла головного мозга плодов человека <i>С.Н. Шумилова</i>	160

**The spectrum of genetic variants in *KISS1*, *GPR54*, *DLK1* and *MKRN3* genes
in precocious puberty****M.B. Kankanam Patiranage, O.Yu. Vasilyeva**

Scientific Supervisor: PhD., E.A. Sazhenova,

Research Institute of Medical Genetics

Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,

Russia, Tomsk, Ushayka river Embankment, 10, 634050

E-mail: manithpathiranage@gmail.com

Abstract. Early or precocious puberty (PPP) in children is a condition in which secondary sexual characteristics appear earlier than the age norm. PPP is clinically defined by the development of secondary sexual characteristics before the age of 8 years in girls and 9 years in boys. The incidence is estimated at 3.7 cases per 10,000 people. The aim of this study was to search for pathogenic, likely pathogenic variants or variants of uncertain clinical significance (Variant of Uncertain Significance, VUS) in *KISS1*, *GPR54*, *DLK1* and *MKRN3* genes in patients with clinical picture of PPS and normal karyotype by mass parallel sequencing. All identified genetic variants were confirmed by Sanger DNA sequencing. The pathogenicity of identified genetic variants was analyzed using online pathogenicity prediction algorithms: Variant Effect Predictor, PROVEAN and Varsome.

Clinically significant genetic variants were found in 4 of 19 probands (21.1 %) with PPS. One patient had a genetic variant in homozygous and one in compound heterozygous. Two patients had heterozygous genetic variants involving two genes. A total of 7 genetic variants were identified, of which: two variants were pathogenic, two were possibly pathogenic, and the remaining variants with uncertain clinical significance. One genetic variant is located in the *DLK1* gene (genetic variant of reading frame shift), one in the *MKRN3* gene (3'-UTR region). The remaining genetic variants were found in the *GPR54* gene (one is a nonsense variant resulting in a stop codon and premature termination of protein synthesis, the rest are missense variants). Thus, 6 out of 7 detected genetic variants are located in the coding region of the studied genes, one in the 3'-UTR non-translated region. Thus, the present study shows the spectrum of genetic variants in *GPR54*, *DLK1* and *MKRN3* genes in children with PPS.

Key words: precocious puberty (PP), genomic imprinting, *DLK1*, *KISS1*, *KISS1R* and *MKRN3* genes

Introduction

Precocious puberty (PP, MIM 176400, 615346) is the onset of puberty earlier than the age norm. This transition is driven by the early activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axes. The frequency of the disease is estimated at 3.7 cases per 10,000 people [1]. PP is clinically determined by the development of secondary sexual characteristics at the age of 8 years in girls and 9 years in boys. In 90 % of girls, the full form of PP is due to pathology of the central nervous system (45 %). Premature thelarche is found in 1 % of girls under the age of 3 years and it occurs 2–3 times more often than true forms of PP [2]. Earlier puberty results in accelerated growth, but eventually stunting develops as a result of the premature closure of the epiphyseal growth zones. Later in life, premature adrenarche is often associated with the formation of polycystic ovary syndrome in teenage girls.

The genetic variants in *KISS1*, *GPR54* (*KISS1R*), *DLK1*, and *MKRN3* genes are described in children with PP [3]. *DLK1* and *MKRN3* are two imprinted genes that are normally expressed only from the paternal homolog [4]. Kisspeptin is a protein product of *KISS1* gene which stimulates the secretion of gonadotropins, thereby participating in the regulation of endocrine function and the onset of puberty [5]. The product of *GPR54* is a regulator of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) production in the hypothalamus and a key factor in the initiation of puberty, acting as a powerful stimulator of the secretion of GnRH-dependent luteinizing hormone [6]. *DLK1* protein functions as a regulator of cell growth. Nucleotide variants in this gene are associated with child and

adolescent obesity. MKRN3 protein blocks the release of gonadotropin-releasing hormone from the hypothalamus, thereby delaying the onset of puberty [7]. The aim of the work was to search for clinically significant genetic variants in the *KISS1*, *GPR54*, *DLK1*, and *MKRN3* genes in the patients with clinical signs of the PP.

Material and methods

Initially the DNA sequence of *KISS1*, *GPR54*, *DLK1*, and *MKRN3* genes were analyzed in 19 girls affected by PP who showed onset of puberty between 5 and 10 years of age, on average 7.9 ± 1.8 years old. Targeted sequencing of all exons of the analyzed genes was performed using the massive parallel sequencing in the MiSeq sequencer (Illumina, USA). All detected genetic variants were confirmed by Sanger sequencing. The pathogenicity of the identified genetic variants was analyzed using online pathogenicity prediction algorithms: Variant Effect Predictor [8], PROVEAN [9] and VarSome [10]. The following databases were used to determine the frequency of detected mutations in control population samples to exclude polymorphic variants in patients: Exome Aggregation Consortium [11], Exome Variant Server [12], 1000 Genomes Project [13] which recommended for data interpretation, obtained by massive parallel sequencing [14].

Results

Clinically significant genetic variants were detected in 4 of 19 probands (21.1 %) with PP. One patient had the genetic variant in a homozygous state and another patient had compound heterozygous state. Two patients had heterozygous genetic variants involving two genes. A total of 7 genetic variants were identified, in which: two variants were pathogenic, two possibly pathogenic, and the remaining variants had uncertain clinical significance (Table 1).

Table 1

Identified genetic variants position and characteristics in patients with precocious puberty

Patient number	Gene	Heterozygous/homozygous	Location	dbSNP ID	Frequency in GnomAD	Identificator	Note (VarSome)
19	<i>DLK1</i>	Heterozygous	c.373delC (p.Gln125fs)	-	-	Frameshift variant	Probably pathogenic
	<i>GPR54</i>	Heterozygous	c.178A>G (p.Asn60Asp)	-	-	Missense variant	Pathogenic
17	<i>GPR54</i>	Heterozygous	c.367C>T (p.Gln123Ter)	-	-	Nonsense variant	Probably pathogenic
	<i>MKRN3</i>	Heterozygous	c.*237delT	rs201081729	0,0000132	3'-UTR variant	Uncertain clinical significance
14	<i>GPR54</i>	Heterozygous	c.191T>C (p.Ile64Thr)	-	-	Missense variant	Uncertain clinical significance
		Heterozygous	c.202T>C (p.Cys68Arg)	-	-	Missense variant	Uncertain clinical significance
10	<i>GPR54</i>	Homozygous	c.233A>G (p.Asn78Ser)	-	0,0000131	Missense variant	Pathogenic

One genetic variant was identified in *DLK1* gene (genetic frameshift variant), another in *MKRN3* gene (3'-UTR region) and the remaining five genetic variants were found in the *GPR54* gene (one is a nonsense variant, leading to the appearance of a stop codon and premature termination of protein synthesis, the rest are missense variants). Thus, 6 out of 7 detected genetic variants are located

in the coding region of the genes studied and one in the 3'-UTR untranslated region. 3'-UTR regions are necessary for regulating translation efficiency, mRNA stability, contain polyadenylation signals and microRNA binding sites, so the detected genetic variant in this region is also important. No significant genetic variants have been found in the *KISS1* gene.

Except two genetic variants all the other identified genetic variants were not found in the population groups. The missense variant c.233A > G (p.Asn78Ser) found in the *GPR54* gene occurs in the population control sample with a frequency of 0.0000131 (GNOMAD). Also, in the 3'-UTR region of *MKRN3* gene, a genetic variant c.*237delT was identified, which occurs in the population with a frequency of 0.0000132. The first variant is pathogenic, and the second variant is uncertain significance. In the control population, both variants are detected with extremely low frequency, so they can also contribute to the formation of PP.

Conclusion

Thus, a spectrum of genetic variants has now been identified in the *GPR54*, *DLK1* and *MKRN3* genes in children with PP.

The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-25-00359.

References

1. Varimo T., Wang Y., Miettinen P.J., et al., Circulating miR-30b levels increase during male puberty // *Eur. J. Endocrinol.* – 2021. – Vol. 184, N.5. – P. K11–K14.
2. Maione L., Bouvattier C., Kaiser U.B., Central precocious puberty: recent advances in understanding the etiology and in the clinical approach // *Clin. Endocrinol.* – 2021. – Vol. 95, № 4. – P. 542–555.
3. Shim Y.S., Lee H.S., and Hwang J.S., Genetic factors in precocious puberty // *Clin. Exp. Pediatr.* – 2022. – Vol. 65, № 4. – P. 172–181.
4. Catalog of imprinted genes and parental effects in humans and animals. – URL: <http://igc.otago.ac.nz>.
5. Maione L., Bouvattier C., Kaiser U.B. Central precocious puberty: recent advances in understanding the aetiology and in the clinical approach // *Clin Endocrinol.* – 2021. – Vol. 95, № 4. – P. 542–555.
6. Seminara S.B., Messager S., Chatzidaki E.E. et al. The *GPR54* gene as a regulator of puberty // *N Engl J Med.* – 2003. – Vol. 349, № 17. – P. 1614–1627.
7. Argente J., Dunkel L., Kaiser U.B. et al. Molecular basis of normal and pathological puberty: from basic mechanisms to clinical implications // *Lancet Diabetes Endocrinol.* – 2024. – Vol. 11, № 3. – P. 203–216.
8. Variant Effect Predictor. – URL: <http://www.ensembl.org/Tools/VEP>.
9. PROVEAN. – URL: http://provean.jcvi.org/genomesubmit_2.php?species=human.
10. VarSome. – URL: <https://varsome.com/variant/hg19>.
11. Exome Aggregation Consortium. – URL: <http://exac.broadinstitute.org/>.
12. Exome Variant Server. – URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
13. 1000 Genomes Project. – URL: <http://browser.1000genomes.org/index.html>.
14. Eijkelenboom A., Tops B.J., van den Berg A. et al. Recommendations for the clinical interpretation and reporting of copy number gains using gene panel NGS analysis in routine diagnostics // *Virchows Arch.* – 2019. – Vol. 474, № 6. – P. 673–680.

УДК 581.6

Разработка технологии инкапсулирования экстракта шалфея *Salviae Folia*

Г.И. Абдракова

Научный руководитель: доцент, к.т.н. Н.Б. Еремеева

Национальный исследовательский университет ИТМО

Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский пр., д.49, лит. А, 197101

E-mail: gulnara_99@mail.ru

Development of technology for encapsulation of sage extract *Salviae Folia*

G.I. Abdrakova

Scientific Supervisor: Ass. Prof., PhD., N.B. Ereemeeva

ITMO University, Russia, St. Petersburg, Kronverksky Pr. 49, bldg. A, 197101

E-mail: gulnara_99@mail.ru

Abstract. *The technology of sage extract encapsulation into protein matrix has been developed. The content of phenolic compounds was analyzed, the thermostability of encapsulated particles was studied. It was found that during encapsulation of biologically active substances of sage into a protein shell the amount of phenolic compounds increases in comparison with pure sage extract. It was also found that when exposed to an external factor like heating, the amount of phenolic compounds decreased compared to control samples. It is likely that the protein shell does not provide sufficient thermal protection of biologically active substances of sage.*

Key words: *encapsulation, Salviae Folia, protein, phenolic compounds.*

Введение

На сегодняшний день организм человека нуждается в поддержке питательными веществами извне как в целом, так и отдельными органами и системами человека [1]. Современных исследователей все больше интересуют продукты, способные оказывать профилактическое и лечебное действие без побочных эффектов. К таким, например, относятся фенольные соединения, полученные из экстракта шалфея *Salviae Folia*. Данные соединения являются нестабильными и подвержены быстрому разложению и улетучиванию при воздействии внешних факторов, таких как изменение температуры и pH [2].

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использованы измельченные *Salviae Folia*. Эксперименты проведены в лабораторных условиях на базе университета НИУ ИТМО.

Работа была разделена на 3 этапа: 1) получение инкапсулированного экстракта; 2) определение содержания фенольных соединений; 3) изучение термостабильности инкапсулята.

На первом этапе проведена экстракция навески измельченного растительного сырья (1,5 г в 30 мл воды). Получен 2 % раствор изолята сывороточного белка. pH раствора довели до 12, используя 1MNaOH. Выдержали 30 мин и смешали с экстрактом шалфея в отношении 1:2. Поставили на магнитную мешалку на 30 мин при 600 об./мин. С помощью 2N HCl довели pH полученной смеси до 7. Центрифугировали 10 мин при 6000 об./мин. Осадок удалили.

На втором этапе проведен анализ содержания фенольных соединений. Применили модифицированный метод Фолин-Чеколтеу [3]. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали водный раствор галловой кислоты. Для проведения анализа взяли 0,5 мл образца или стандарта галловой кислоты, добавили 4 мл дистиллированной воды, 0,25 мл реактива Фолин-Чеколтеу и 0,25 мл насыщенного водного раствора карбоната натрия. Образцы встряхнули и выдержали в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре. Коэффициент поглощения определяли при 725 нм. Результаты

выражали в моль эквивалента галловой кислоты в л экстракта (моль ГК/л). Эксперимент проводился в трехкратном повторении.

На третьем этапе оценена термостабильность биоактивных компонентов шалфея после инкапсулирования в белковый сыывороточный изолят. Инкапсулированные частицы выдержали на водяной бане 5 ч при температуре 80 °С. Количество оставшихся фенольных соединений измерили методом, описанным во втором этапе [4].

Результаты

Результаты определения содержания количества фенольных соединений в экстракте шалфея и инкапсулированных частицах представлены на рисунке 1.

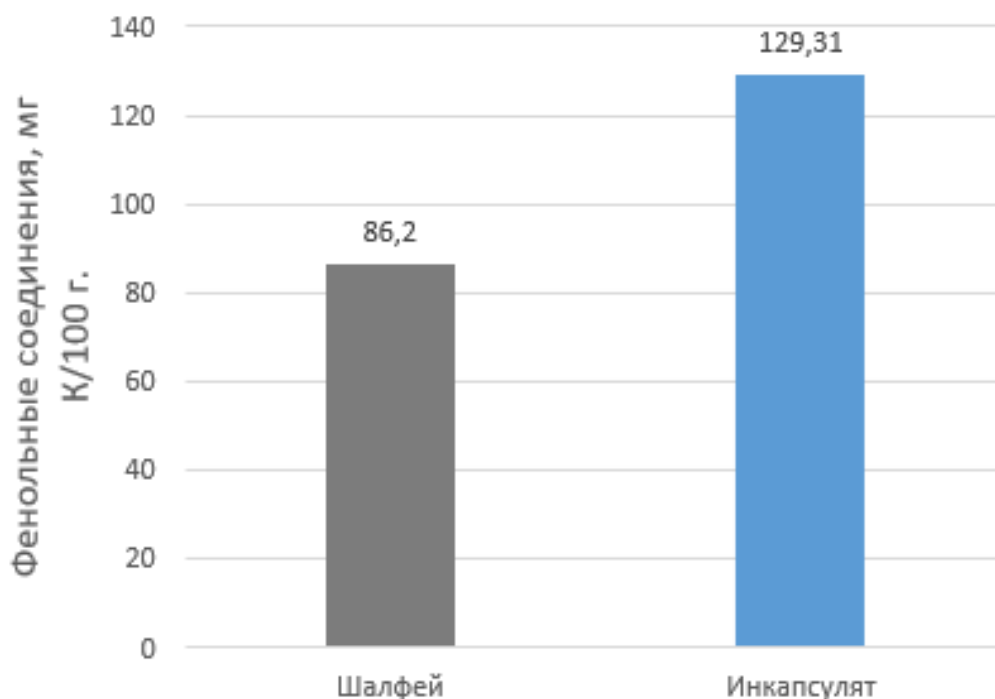


Рис. 1. Содержание фенольных соединений в шалфее и инкапсуляте

После инкапсуляции биологически активных веществ шалфея в белковую оболочку возросло количество фенольных соединений. Вероятно, это произошло из-за увеличения стабильности и защиты веществ от воздействия внешнего окисления. Кроме того, белковая матрица способна улучшить биодоступность активных веществ, что также может повысить их количество в конечном продукте.

Термическая стабильность. Результат определения содержания общего количества фенольных соединений после нагревания представлен на рисунке 2.

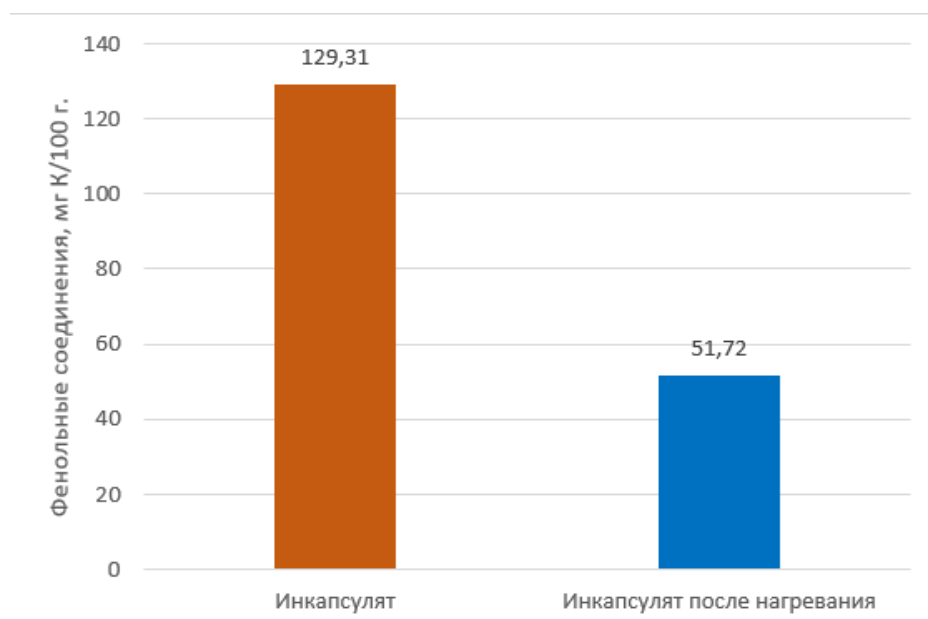


Рис. 2. Содержание фенольных соединений в инкапсуляте после нагревания

Установлено, что после нагревания инкапсулированного экстракта понизилось количество фенольных соединений. Известно, что фенольные соединения могут быть чувствительны к высоким температурам и могут разлагаться при нагревании. Из этого можно сделать вывод, что белковая оболочка не обеспечивает полную термическую защиту БАВ шалфея.

Заключение

В ходе исследования установлено, что инкапсуляция приводит к повышению общего количества фенольных соединений. Вероятно, что белковая оболочка способствует увеличению биодоступности БАВ шалфея *Salviae Folia*. Необходимо отметить, что фенольные соединения известны своими антиоксидантными свойствами, которые помогают защищать клетки от повреждений, связанных с окислительным стрессом. Поэтому, повышение содержания этих веществ в инкапсулированном растворе может повысить его ценность как пищевой или лечебно-профилактический продукт.

Список литературы

1. Патент РФ 2752781, МПК A23L 33/10, A23L 33/105, A61K 36/00. Биологически активная добавка к пище капсулированной формы / Бркич Г.Э., Пятигорская Н.В., Зырянов О.А., Завгородний А.А.; Заявитель: Производственно-коммерческая фирма "ФИТОФАРМ". – EDN GBWWDB. – 2020142503; заявл. 22.12.2020; опубл. 03.08.2021.
2. Gulín-Sarraz T., Kalantzopoulos G.N., Kvalvåg Pettersen M., Wold Åsli A., Tho I., Axelsson L., Sarraz J. Inorganic Nanocarriers for Encapsulation of Natural Antimicrobial Compounds for Potential Food Packaging Application: A Comparative Study // *Nanomaterials*. – 2021. – V. 11, № 379. – P. 1–19.
3. Hamed Y.S., Abdin M., Akhtar H.M.S., Chen D., Wan P., Chen G., Zeng X. Extraction, purification by macrospores resin and in vitro antioxidant activity of flavonoids from *Moringa oliefera* leaves // *South Afr. J. Bot.* – 2019. – V. 124. – P. 270–279.
4. Chen S., Li Q., McClements D.J., Han Y., Dai L., Mao L., Gao Y. Co-delivery of curcumin and piperine in zein-carrageenan core-shell nanoparticles: Formation, structure, stability and in vitro gastrointestinal digestion // *Food Hydrocolloids*. – 2019. 105334. DOI:10.1016/j.foodhyd.2019.105334

УДК 615.2, 615.06

**Анальгетическое и психотропное действие
нового антагониста рецепторов брадикинина**А.Е. Алифоренко, В.В. Быков

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

Сибирский государственный медицинский университет

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

E-mail: gundareva_ae@mail.ru

Analgesic and psychotropic effects of a new bradykinin receptor antagonistA.E. Aliforenko, V.V. Bykov

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

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

E-mail: gundareva_ae@mail.ru

Abstract. A 1,4-benzodiazepin-2-one derivative, codenamed PAV-0056, after orally administration to mice at doses of 0.1 and 1 mg/kg has a pronounced analgesic effect in the formalin test no weaker than the effects of diclofenac sodium (10 mg/kg) and tramadol (20 mg/kg). The PAV-0056 compound at doses of 0.1 and 10 mg/kg has no anxiolytic and central muscle relaxant effects in mice.

Key words: analgesic effect, 1,4-benzodiazepin-2-one, psychotropic effect.

Введение

Брадикинин выполняет физиологические функции в результате селективной активации метаболитных В-рецепторов. При активации В₁-рецепторов на чувствительных нервных окончаниях развивается деполяризация и возникает болевой потенциал действия [1, 2]. Производные 1,4-бензодиазепин-2-она, имеющие пропоксигруппу в третьем положении бензодиазепинового цикла, блокируют В₁-рецепторы и обладают анальгетическим действием [3]. В структуру производного 1,4-бензодиазепин-2-она, обозначенного шифром PAV-0056, включены метоксикарбонилметильный заместитель и нитрогруппа. Такая модификация молекулы позволила усилить блокирующее влияние на В₁-рецепторы и снизить аффинитет к центральным бензодиазепиновым рецепторам [4].

Целью исследования являлось изучение анальгетического действия и нежелательных побочных эффектов соединения PAV-0056: противотревожное влияние и способность вызывать центральную миорелаксацию.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на 130 свободных от патогенной флоры мышей самцах линии CD-1 массой тела 20–25 г (в каждой группе по 10 особей). Для оценки анальгетического действия в желудок мышам вводили соединение PAV-0056 в дозах 0,1 и 1 мг/кг, диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг или трамадол в дозе 20 мг/кг. Все вещества растворяли в 0,5 мл 1 % водного раствора поливинилпирролидона. Контрольные животные получали растворитель в эквивалентном объеме. Через 60 мин после введения исследуемых веществ мышам субплантарно вводили 0,02 мл 0,5 % водного раствора формалина. В течение первых 15 мин (фаза острой боли) и последующих 45 мин (фаза тонической боли) регистрировали болевые реакции по количеству облизываний и потряхиваний поврежденной лапы [5].

Потенциальные противотревожный и центральный миорелаксирующий эффекты исследовали в экспериментах на мышах через 60 мин после введения в желудок соединения PAV-0056 в дозах 0,1 и 10 мг/кг или феназепама в дозе 1 мг/кг. Для оценки противотревожного влияния животных помещали на центральную площадку установки «приподнятый крестообразный лабиринт». В течение 5 мин оценивали время нахождения

мышей в открытом и закрытом рукавах лабиринта и количество заходов в них. Критерием противотревожного действия считали удлинение времени нахождения мышей в открытых рукавах и увеличение числа заходов в них [5]. Воздействие на тонус скелетных мышц исследовали по продолжительности удерживания мышей на вращающемся стержне Rota Rod (Ugo Basile, Италия) [5].

Результаты обрабатывали статистически в программе Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Данные представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Достоверность различий между группами устанавливали по критерию Манна-Уитни при $p < 0,05$.

Результаты

При субплантарной инъекции раствора формалина соединение PAV-0056 в дозах 0,1 и 1 мг/кг уменьшало количество болевых реакций в фазе острой боли на 54,8 и 48,4 %, в фазе тонической боли — на 63 и 46,7 % соответственно ($p < 0,05$). Диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг и трамадол в дозе 20 мг/кг оказывали анальгетическое действие в обеих фазах — снижали количество болевых реакций на 32,3–53,3 % ($p < 0,05$) (таблица 1).

Таблица 1

Анальгетическое действие соединения PAV-0056, диклофенака натрия и трамадола при введении в желудок мышам после субплантарной инъекции раствора формалина ($M \pm m$) ($n = 10$)

Экспериментальная группа	Количество болевых реакций	
	Фаза острой боли	Фаза тонической боли
Раствор поливинилпирролидона (контроль)	31 ± 3	15 ± 2
PAV-0056, 0,1 мг/кг	$14 \pm 1^*$	$6 \pm 2^*$
PAV-0056, 1 мг/кг	$16 \pm 1^*$	$8 \pm 3^*$
Диклофенак натрия, 10 мг/кг	$20 \pm 4^*$	$7 \pm 2^*$
Трамадол, 20 мг/кг	$21 \pm 3^*$	$9 \pm 2^*$

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

При введении соединения PAV-0056 в дозах 0,1 и 10 мг/кг или раствора поливинилпирролидона мыши не выходили в открытые рукава «приподнятого крестообразного лабиринта» и предпочитали находиться в закрытых рукавах. Под влиянием феназепама в дозе 1 мг/кг мыши чаще выходили в открытые рукава лабиринта, проводили там больше времени, чаще заглядывали в открытые рукава ($p < 0,05$) (таблица 2).

Таблица 2

Влияние соединения PAV-0056 и феназепама на уровень тревожности мышей в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» ($M \pm m$) ($n = 10$)

Показатель / Экспериментальная группа	Раствор поливинил- пирролидона (контроль)	PAV-0056, 0,1 мг/кг	PAV-0056, 10 мг/кг	Феназепам, 1 мг/кг
Латентный период до выхода в открытый рукав, с	85 ± 19	36 ± 6	33 ± 8	$5 \pm 1^*$
Время в открытом рукаве, с	15 ± 2	24 ± 6	26 ± 6	$54 \pm 3^*$
Время в закрытом рукаве, с	200 ± 11	182 ± 7	218 ± 15	201 ± 13
Количество заходов в открытый рукав	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	$6 \pm 1^*$
Количество заходов в закрытый рукав	7 ± 1	8 ± 1	7 ± 2	4 ± 1

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

Соединение PAV-0056 в дозах 0,1 и 10 мг/кг не укорачивало продолжительность удерживания мышей на вращающемся стержне ($p > 0,05$). Феназепам в дозе 1 мг/кг уменьшал время удерживания мышей в 1,5 раза по сравнению с показателем контрольной группы ($p < 0,05$) (рис. 1).

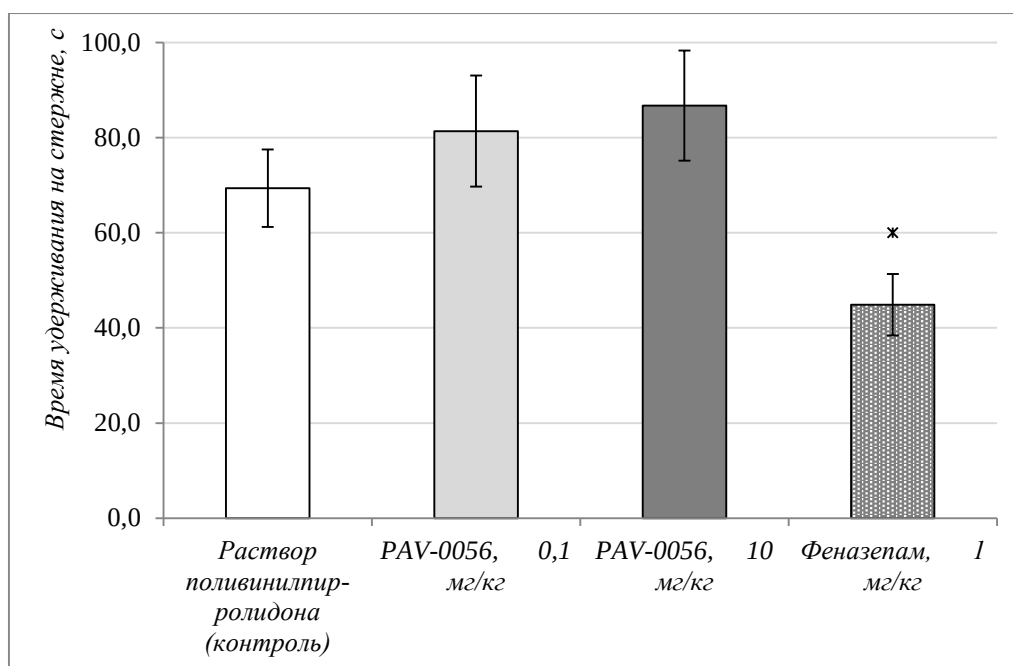


Рис. 1. Влияние соединения PAV-0056 и феназепама на продолжительность удерживания мышей на вращающемся стержне. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем ($n = 10$)

Заключение

Производное 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 оказывает анальгетическое действие, обусловленное блокадой V_1 -рецепторов брадикинина в очаге воспаления. Оно вызывало анальгезию в обеих фазах формалинового теста: в первой фазе ослабляло активацию ноцицепторов, во второй — препятствовало центральной сенситизации. В отличие от анксиолитика феназепама, соединение PAV-0056 не обладает противотревожным и центральным миорелаксирующим действием. Это позволяет предположить, что вещество PAV-0056 не влияет на бензодиазепиновые рецепторы и не усиливает тормозящее влияние гамма-аминомасляной кислоты на ГАМК_A-рецепторы в лимбической системе и стволе мозга.

Полученные данные позволяют позиционировать производное 1,4-бензодиазепин-2-она PAV-0056 как потенциальный анальгетик без побочных психотропных эффектов, характерных для производных бензодиазепина.

Список литературы

1. Yin Y.L., et al. Molecular basis for kinin selectivity and activation of the human bradykinin receptors // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2021. – Vol. 28. – P. 755–761.
2. Shen J.K., et al. Function and structure of bradykinin receptor 2 for drug discovery // Acta Pharmacol. Sin. – 2023. – Vol. 44. – P. 489–498.
3. Pavlovsky V.I., et al. Analgesic effects of 3-substituted derivatives of 1,4-benzodiazepines and their possible mechanisms // Neurophysiology. – 2013. – Vol. 45. – P. 427–432.
4. Патент 2701557 РФ. МПК C07D 243/24, A61K 31/5513, A61P 25/04, A61P 25/24, A61P 25/28. Производные 1,4-бензодиазепин-2-она и их применение / В.И. Павловский, В.А. Хазанов, С.А. Станкевич ; заявитель ООО «Ифар». – № 2017141001 ; заявл. 24.11.2017 ; опубл. 30.09.2019, Бюл. № 28. – 34 с.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2013. – 944 с.

УДК159.9

**Роль полиморфизмов гена дофамина рецептора (rs6277 и rs1800497 DRD2)
в развитии интернет-зависимости у славян и тувинцев**

К.В. Афоничева

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

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера,

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

E-mail: kseniya.kopylova@yandex.ru

**The role of polymorphisms of the dopamine receptor (rs6277 and rs1800497 of the DRD2 gene)
in the development of Internet addiction among Slavs and Tuvans**

K.V. Afonicheva

Scientific Supervisor: PhD., M. V. Smolnikova

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

Zheleznyaka st. 3g., 660022

E-mail: kseniya.kopylova@yandex.ru

Abstract. *In the present study, we performed testing adolescents using the Chen scale to determine the Internet addiction and genetic testing of DNA using real-time polymerase chain reaction to identify the genotypes of the rs6277 and rs1800497 polymorphisms of the dopamine receptor type 2 gene DRD2. We identified differences in the frequency genotypes and alleles between ethnic groups of Slavs and Tuvans and between adolescents with and without Internet addiction.*

Key words: *dopamine, polymorphism, internet addiction, populations.*

Введение

Одним из нейромедиаторов, обеспечивающих связь между нейронами, является дофамин. Ген дофамина рецептора второго типа (DRD2) определяет развитие синдрома дефицита вознаграждения [1]. Дофаминэргическая система вознаграждения ассоциирована с ожирением, патологическим увлечением азартными играми, алкогольной и никотиновой зависимостью [2]. Однонуклеотидные замены в гене DRD2 приводят к изменению уровня экспрессии дофамина рецептора. Минорные аллели Т полиморфизмов rs1800497 и rs6277 связаны с более низким уровнем экспрессии рецептора дофамина второго типа и ассоциированы с риском развития психических расстройств и зависимостей [3, 4]. В соответствии с тем, что распространенность полиморфизмов rs1800497 и rs6277 гена DRD2 среди популяций мира имеет особенности целью работы было изучение распространенности генотипов и аллелей полиморфизмов rs1800497 и rs6277 гена DRD2 у славян и тувинцев с интернет-зависимостью (ИЗ), оцененной по шкале Чен (CIAS).

Экспериментальная часть

Проведено тестирование подростков по шкале Чен и генетическое тестирование образцов их ДНК с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. В исследовании участвовали 417 подростков 9–18 лет из школ Красноярска и Кызыла, которые на основании результатов тестирования были разделены на группы: лица, не обладающие признаками ИЗ (не ИЗ, 27–64 балла) и лица с признаками ИЗ (ИЗ, более 65 баллов). Популяции включенных в исследование подростков определялись согласно анкетным данным (славяне (n = 351), тувинцы (n = 66)). От подростков или их родителей (законных представителей) получены информированные согласия.

Исследование одобрено этическим комитетом ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (протокол № 6 от 06.11.2012 г.).

Сравнение частоты аллелей и генотипов между группами проводили с помощью онлайн-калькулятора <https://medstatistic.ru>.

Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

Результаты

В работе проведен сравнительный анализ частоты распространенности генотипов и аллелей полиморфных локусов гена *DRD2* у славян и тувинцев (таблица 1). Показано, что частота встречаемости гомозиготного генотипа СС полиморфного варианта rs1800497 гена *DRD2* выше в популяции славянских подростков, которые по результатам тестирования, имеют признаки ИЗ, относительно группы тувинцев (74,6 % против 41,2 %, $p < 0,05$). Выявлены различия в частоте распространенности гетерозиготного генотипа СТ полиморфизма rs1800497 гена *DRD2* – в популяции интернет-зависимых тувинцев этот генотип встречается чаще по сравнению с популяцией славян (52,9 % против 20,6 %, $p < 0,05$). Гомозиготный генотип ТТ чаще наблюдается у группы не интернет-зависимых тувинцев (12,2 % против 2,7, $p < 0,05$). Аллельный вариант Т данного полиморфизма статистически значимо чаще встречается у интернет-зависимых тувинцев по сравнению с группой славян (0,3 % против 0,2 %, $p < 0,05$).

Установлено, что генотип СС полиморфизма rs6277 гена *DRD2* реже встречается у интернет независимых подростков славян относительно тувинцев (30,9 % против 55,1, $p < 0,05$). При сравнении частота распространенности гетерозиготного генотипа СТ полиморфного локуса rs6277 гена *DRD2* выше у независимых от интернета славян относительно тувинцев (47,2 % против 30,6 %, $p < 0,05$). Выявлено, аллельный вариант С данного полиморфизма чаще встречается в популяции тувинских подростков без признаков ИЗ, чем у славян (0,7 % против 0,5 %, $p < 0,05$).

Таблица 1

Структурный состав интернет-зависимости среди подростков согласно тесту Чен в зависимости от этнической принадлежности, (% , n)

Генотип/Аллель	Славяне, n=351		Тувинцы n=66		p
	ИЗ, n = 63 (1)	He ИЗ, n = 288 (2)	ИЗ, n = 17 (3)	He ИЗ, n = 49 (4)	
rs1800497 DRD2					
CC	74,6 (47)	67,5 (194)	41,2 (7)	55,1 (27)	1,3 = 0,010
CT	20,6 (13)	29,8 (86)	52,9 (9)	32,7 (16)	1,3 = 0,009
TT	4,8 (3)	2,7 (8)	5,9 (1)	12,2 (6)	2,4 = 0,003
C	0,8	0,8	0,7	0,7	1,3 = 0,02
T*	0,2	0,2	0,3	0,3	2,4 = 0,01
rs6277 DRD2					
CC	33,3 (21)	30,9 (89)	35,29 (6)	55,1 (27)	2,4 < 0,001
CT	39,7 (25)	47,2 (136)	47,1 (8)	30,6 (15)	2,4 = 0,031
TT	27,0 (17)	21,9 (63)	17,6 (3)	14,3 (7)	-
C	0,5	0,5	0,6	0,7	2,4 = 0,003
T*	0,5	0,4	0,4	0,3	

Заключение

Результаты настоящего исследования показали значимые различия в частоте встречаемости генотипов и аллелей между этническими группами и между подростками с признаками интернет-зависимости и без них.

Литературные данные показывают, что полиморфизмы rs1800497 и rs6277 ассоциированы с пониженной экспрессией гена *DRD2*, что приводит к развитию

психических расстройств и зависимостей, включая наркоманию, алкоголизм, азартные игры из-за снижения ощущения удовлетворения от нормальных стимулов и поиска альтернативных источников удовольствия [5, 6].

Полученные ранее данные свидетельствуют, что наличие полиморфизма rs1800497 *DRD2* может быть фактором риска развития особенностей пищевого поведения, и предрасполагает детей к большому потреблению пищи и, как следствие, ожирению [7]. Показано, что генотипы СТ и ТТ полиморфного локуса rs6277 гена рецептора дофамина второго типа обуславливают повышенный риск развития проблем с поведением, а также проявление агрессивного поведения у детей и подростков [8].

В настоящем исследовании выявлено, что частота встречаемости гомозиготного генотипа СС полиморфного варианта rs1800497 гена *DRD2* выше среди славянских подростков с признаками ИЗ. При этом показаны различия в частоте распространенности гетерозиготного генотипа СТ и аллельного варианта Т этого полиморфизма – так, относительно славянской популяции данный полиморфизм чаще наблюдается у тувинцев.

Необходимо учитывать, что результаты данного исследования основаны на относительно небольшой выборке и могут быть подвержены влиянию других факторов, например культурных и социальных различий между популяциями. Настоящее исследование подчеркивает важность изучения генетических факторов, влияющих на развитие интернет-зависимости, поскольку это необходимо для разработки индивидуализированных подходов к профилактике и лечению ИЗ с учетом генетических особенностей этнических групп.

Список литературы

1. Koob G.F., Volkow N.D. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis // *Lancet Psychiatry*. – 2016. – № 8. – P. 760–773.
2. Ulucan K. et al. Distribution of Dopamine Receptor 2 *DRD2* rs1800497 Polymorphisms in Professional Football Players: 2 // *Türk Spor ve Egzersiz Dergisi*. – 2021. – № 2. – P. 185–189.
3. Mattioni J., Vansteene C., Poupon D., Gorwood P., Ramoz N. Associated and intermediate factors between genetic variants of the dopaminergic D2 receptor gene and harmful alcohol use in young adults // *Addict Biol*. – 2023. – № 3. – P. e13269.
4. Jung Y., Montel R.A., Shen P.H., Mash D.C., Goldman D. Assessment of the Association of D2 Dopamine Receptor Gene and Reported Allele Frequencies With Alcohol Use Disorders // *JAMA Netw Open*. – 2019. – № 11. – P. e1914940.
5. Kraschewski A., Reese J., Anghelescu I. et. al. Association of the dopamine D2 receptor gene with alcohol dependence: haplotypes and subgroups of alcoholics as key factors for understanding receptor function // *Pharmacogenet Genomics*. – 2009. – № 7. – P. 513–527.
6. Guerri L., Dobbs L.K., da Silva E Silva D.A., et al. Low Dopamine D2 Receptor Expression Drives Gene Networks Related to GABA, cAMP, Growth and Neuroinflammation in Striatal Indirect Pathway Neurons // *Biological Psychiatry Global Open Science*. – 2023. – № 4. – P. 1104–1115.
7. Obregón A.M., Valladares M., Goldfield G. Association of the dopamine D2 receptor rs1800497 polymorphism and eating behavior in Chilean children // *Nutrition*. – 2017. – № 35. – P. 139–145.
8. Della Torre O.H. Paes LA, Henriques T. et al. Dopamine D2 receptor gene polymorphisms and externalizing behaviors in children and adolescents // *BMC Med Genet*. – 2018. – № 1. – P. 65.

УДК 574.5

**Использование биоиндикационных индексов для анализа экологического состояния
малых рек степной части Южного Урала**М.В. Бардуков

Научный руководитель: доцент, к.б.н., Н.С. Батурина

Новосибирский государственный университет,

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

E-mail: m.bardukov7@mail.ru**The use of bioindication indices for the analysis of the ecological state
of small rivers of the steppe part of the Southern Urals**M.V. Bardukov

Scientific Supervisor: Ass. Prof. PhD., N.S. Baturina

Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk region, Novosibirsk, Pirogova str., 2, 630090

E-mail: m.bardukov7@mail.ru

Abstract: The paper presents the results of a comparative analysis of bioindication indices and indicators for assessing the water quality of small rivers. The small Bersuvan River of the steppe zone of the Southern Urals, studied as part of environmental monitoring, was selected as a reference water body. According to the calculation of the water pollution index, it was found that the water quality of the Bersuvan River at all surveyed points corresponds to β - mesosaprobic. For a comparative analysis of the effectiveness of biotic indicators, the methods and metrics proposed by the European Union Water Framework Directive and traditionally used in the regions of the Russian Federation were used. A list of identified taxa with an indicative value was compiled. Statistical analysis of indices as environmental indicators at various sampling points of the Bersuvan River showed that the indices are the most effective for bioindication purposes due to the characteristics of the formed community in the study area. the importance of indices as indicators.

Key words: zoobenthos, bioindication, Bersuvan, Southern Urals.

Введение

В настоящее время функционирование и регуляция работы многих наземных экосистем претерпевают довольно значительные изменения, связанные, в первую очередь, с повышением антропогенной нагрузки. Часто вмешательство человека в ход естественных циклических процессов, энергетические связи, которыми характеризуются все природные экосистемы, приводит к разрушительным результатам: от смены доминирующих сообществ до полного исчезновения и обеднения естественных экосистем. Примечательно, что на территории Южного Урала, как и в большинстве других регионах мира, практически не осталось водоемов и водотоков, которые можно было бы классифицировать как естественные и «чистые» [1–6].

Цель: выявить особенности использования биоиндикационных индексов для оценки экологического состояния малых рек Южного Урала (на примере реки Берсувань).

Задачи: 1) изучить таксономический состав, структуру сообществ бентоса реки Берсувань; 2) выявить тенденции изменения структуры бентических сообществ под влиянием смены гидроэкологических условий и характера биотопа; 3) выявить особенности использования биоиндикационных индексов для анализа экологического состояния малых рек степной части Южного Урала.

Экспериментальная часть

Отбор проб проводили стандартными методами с помощью штангового дночерпателя (ДАК-250). Для определения таксономического состава проб зообентоса были использованы

микроскопы МБС-10 и Биолам С-111. При определении видового состава гидробионтов использовался определитель [М. В. Чертопруд и др., 2003]. Для определения загрязнения воды были рассчитаны индекс Серенсена, биотический индекс Вудивисса, индекс сапробности Пантле–Букк, индекс Шеннона, индекс сапробности Кольквитца–Марссона.

Для оценки таксономического состава зообентоса р. Берсувань были выбраны 3 точки, оцениваемые по 4 параметрам (таблица 1).

Таблица 1

Физико-химические показатели точек отбора

Параметр	Точка 1	Точка 2	Точка 3
Тип грунта	Каменистый	Песчано-глинистый	Глинистый
Уровень антропогенной нагрузки	1	1	3
Расстояние до устья	15705 м	10061 м	3847 м
Температура воды в реке, °С	18	19	20

На каменистом и песчано-илистом грунтах реки формируются донные сообщества с доминированием двустворчатых моллюсков и личинок насекомых, характерные для приустьевых участков равнинных рек, испытывающих умеренную антропогенную нагрузку. На глинистом грунте, расположенном на участке реки, подверженном значительному антропогенному воздействию, сформировалось сообщество зообентоса с доминированием пиявок и моллюсков, характерное для антропогенно нарушенных участков равнинных рек. В ходе работы выявлены 59 таксонов, относящиеся к 6 классам, 16 отрядам, 35 семействам. При выделении сообществ донных организмов учитывали доминирующие таксономические группы, оценивали влияние физических характеристик биотопа. Анализ структуры сообществ биоиндикаторов выявил, что в биотопах 1 и 2 наибольшее количество видов относится к обитателям слабо загрязненных вод (β -мезосапробам), а в биотопе 3 преобладают обитатели грязных вод (α -мезосапробное). Необходимо отметить изменение характерного таксономического состава сообществ в точках 1 и 3. Это связано с изменением гранулометрического состава грунта, не характерного для большинства малых рек степной части Южного Урала, и с повышением антропогенной нагрузки, на что могут указывать данные индексов (таблица 2).

Таблица 2

Данные расчетов биоиндикационных индексов

Индекс	Биотоп		
	I	II	III
Кольквитц-Марссона	β -мезосапробное	β -мезосапробное	α -мезосапробное
Вудивисс	2,2 β -мезосапробная	2,5 β -мезосапробная	3,4 α -мезосапробная
Пантле-Букк	умеренно-загрязненная	умеренно-загрязненная	умеренно-загрязненная

Результаты

По итогам исследования состав зообентоса реки Берсувань представлен следующими живыми организмами – всего было найдено 59 видов беспозвоночных, в том числе пиявок – 3, брюхоногих моллюсков – 5, двустворчатых моллюсков – 8, ракообразных – 2, паукообразных – 1, насекомых – 40 вид.

На каменистом и песчано-глинистом грунтах реки формируются донные сообщества с доминированием двустворчатых моллюсков и личинок насекомых, характерные для приустьевых участков равнинных рек, испытывающих умеренную антропогенную нагрузку. На глинистом грунте, расположенном на участке реки, подверженном значительному

антропогенному воздействию сформировалось сообщество зообентоса с доминированием пиявок и моллюсков, характерное для антропогенно нарушенных участков равнинных рек. Трофическая структура зообентоса реки Берсувань разнообразна, в ней доминируют виды, которые питаются дифференцированно (крупными объектами) – зоофаги и фитофаги. Это свидетельствует о благополучном состоянии реки.

Состояние реки Берсувань в настоящее время оценивается как «умеренно-загрязненное» на протяжении всего исследованного участка, за исключением приустьевой зоны, которая характеризуется как «грязная». Можно отметить, что антропогенная нагрузка на исследованный водный объект в последние несколько лет оставалась стабильной высокой, что оказалось дополнительным фактором, вызывающим изменения структуры бентосных сообществ.

Анализ литературных источников показал улучшение показателей ПДК по РБ, в частности, в период с 2018 по 2022 год произошли следующие изменения (Мп, с 18 до 16), (УКИЗВ, с 3,88 до 3,08), (Фенолы, с 2 до нормализации показателей). Однако данные биоиндикационных индексов не подтверждают положительные изменения в локальном участке отбора проб, показывая ухудшение экологической обстановки. Следовательно, необходимы дополнительные исследования, уточняющие данные индексов.

Список литературы

1. Баканов А.И. Использование зообентоса для мониторинга пресноводных водоёмов // Биология внутренних вод. – 2000. – № 1. – С. 68–82.
2. Безматерных, Д.М. Зообентос как основа типизации экосистем водотоков бассейна верхней Оби / Д.М. Безматерных // Мир науки, культуры, образования. – 2007. – Т. 1, № 4. – С. 17–19.
3. Краткий определитель беспозвоночных пресных вод центра Европейской России / М. В. Чертопруд, Е. С. Чертопруд; Моск. гос. унитар. предприятие "Мосводоканал", МГУ им. М.В. Ломоносова. Каф. гидробиологии биол. фак. МГУ, Междунар. биотехнол. центр МГУ. – Москва: Макс Пресс, 2003. – 195, [1] с.: ил.; 21 см.; ISBN 5– 317–00893–Х: 200
4. Полякова Т.В. Донные членистоногие р. Берсувань как носители личинок гельминтов // Природные ресурсы Республики Башкортостан. – Уфа: БГПИ, 2003. – С. 52–54.
5. Умнов Л.Ю. Оценка экологического состояния водотоков НИ «Таганай» по показательным организмам макробентофауны и их разнообразию // Пути сохранения биоразнообразия и биологическое образование: Труды Всероссийской научно-практической конференции. – Елабуга: ЕШУ, 2005. – С. 99–100/
6. Biological methods for the assessment of water quality // Ed. Cairns J. & K. L. Dickson, Philadelphia, 1973.

УДК 616-092.9:616-092.4

Продукция H₂S в клетках жировой ткани крыс при метаболическом синдроме

Ю.Г. Бирулина, Е.Е. Буйко, А.В. Григорьева

Научный руководитель: доцент, к.б.н. Ю.Г. Бирулина
Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050
E-mail: birulina20@yandex.ru

Hydrogen sulfide production in adipose tissue of rats with metabolic syndrome

Yu.G. Birulina, E.E. Buyko, A.V. Grigoreva

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., PhD., Yu.G. Birulina
Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow Trakt str., 2, 634050
E-mail: birulina20@yandex.ru

Abstract. Over the last several decades, hydrogen sulfide (H₂S) has gained attention as a new signaling molecule, with extensive physiological and pathophysiological roles in disorders affecting vascular biology, immune functions, cellular survival, metabolism. Evidence is emerging confirming the importance of H₂S in the pathophysiology of obesity, type 2 diabetes mellitus, and metabolic syndrome (MetS). We showed that during hyperglycemia and insulin resistance induced by a high-calorie diet, the CSE-dependent pathway of H₂S synthesis was suppressed.

Key words: metabolic syndrome, hydrogen sulfide, adipose tissue.

Введение

Газотрансммиттеры представляют собой небольшие молекулы эндогенного газа, которые обладают способностью диффундировать в клетки для взаимодействия со своими мишенями, индуцируя ряд внутриклеточных сигнальных реакций [1, 2]. Сероводород (H₂S), наряду с оксидом азота (NO) и оксидом углерода (CO), также принадлежит к семейству газомедиаторов [3, 4]. Несмотря на то, что H₂S был ранее известен как токсичный газ, многочисленные экспериментальные исследования показывают, что он производится ферментативно во многих клетках организма млекопитающих и человека, а также опосредует ряд физиологических функций: регуляция сосудистого тонуса, ангиогенеза [4], нейротрансмиссии [3], продукции инсулина [2], апоптоза, воспалительной реакции [5] и др. Появляются данные, подтверждающие важность H₂S в патофизиологии ожирения, сахарного диабета 2 типа, метаболического синдрома (МС). В связи с этим, целью исследования явилось изучение продукции H₂S в жировой ткани крыс при экспериментальном МС.

Материалы и методы исследования

Модель МС была воспроизведена на крысах Wistar (25 самцов, возраст на начало исследования 6 недель). Протокол исследования был одобрен Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных (IACUC) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол №1 от 25.04.2022 г.). Животные были распределены на контрольную (n = 13) и экспериментальную (n = 12) группы. Крысы контрольной группы получали стандартный корм («Чара», Ассортимент-Агро, РФ). Крысы экспериментальной группы в течение 12 недель находились на высокожировой и высокоуглеводной диете (ВЖВУД) с заменой питьевой воды на 20% раствор фруктозы. Животных выводили из эксперимента СО₂-эвтаназией. Выполняли забор крови из сердца, которую затем центрифугировали (2000 g, 10 мин) для получения сыворотки. Извлекали и взвешивали висцеральную жировую ткань, фрагменты эпидидимальной жировой ткани замораживали в жидком азоте. В сыворотке крови определяли концентрацию глюкозы (Glucose-TR,

Chronolab, Испания), инсулина (Insulin Rat ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, США), лептина (Rat Leptin ELISA Kit, ELK Biotechnology, КНР).

Концентрацию H_2S в сыворотке крови крыс определяли, как описано [6], с использованием многофункционального микропланшетного ридера Tecan Infinite200 (Infinite 200 Pro M-plex, Tecan, Швейцария). Концентрацию H_2S в сыворотке крови рассчитывали по калибровочной кривой с использованием NaHS (1–250 мкМ) и выражали в мкМ. Концентрацию H_2S в жировой ткани крыс определяли, как описано [7]. Содержание H_2S в каждом образце рассчитывали по калибровочной кривой NaHS (1–250 мкМ), а результаты выражали в нмоль образовавшегося H_2S /мг белка. Содержание АФК в эпидидимальной жировой ткани определяли флуоресцентным методом с помощью микропланшетного ридера (Infinite 200 Pro M-plex, Tecan, Швейцария). Для определения содержания восстановленного глутатиона (GSH) жировую ткань после размораживания (100 мг) гомогенизировали в 5 % растворе сульфосалициловой кислоты, затем центрифугировали при 15000 g (2–4 °C, 15 мин), собирали супернатант и фотометрировали на спектрофотометре СФ-2000 (Спектр, РФ). Количественное определение белка выполняли в реакции с бикарбонной кислотой (BCA Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich, США). Результаты представляли в нмоль/мг белка.

Статистическую обработку данных проводили в программе SPSS Statistics 23. Данные, подчиняющиеся нормальному закону распределения, представлены в виде среднего (M) и стандартного отклонения ($\pm SD$), неподчиняющиеся – медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (Q25; Q75). Анализ различий между выборками выполняли при помощи t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки взаимосвязи между показателями определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

ВЖБУД вызывала увеличение массы тела, удельной массы висцеральной жировой ткани, уровня глюкозы, инсулина в сыворотке крови крыс опытной группы. Концентрация H_2S в сыворотке крови, жировой ткани и продукция H_2S адипоцитами экспериментальных животных снижалась по сравнению с животными контрольной группы (таблица 1). Вероятно, на фоне возникающей гипергликемии и инсулинорезистентности при питании крыс высококалорийным рационом происходило подавление CSE-зависимого пути синтеза H_2S .

Таблица 1

Концентрация H_2S в сыворотке крови, жировой ткани и его продукция при МС

Параметр	Группа	
	Контрольная (n = 13)	Экспериментальная (n = 12)
H_2S в сыворотке крови, мкМ	19,5 $\pm$ 4,6	15,2 $\pm$ 1,9*
H_2S в жировой ткани, нмоль/мг белка	1,4 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,2*
Продукция H_2S в жировой ткани, пмоль/мин/мг белка	213,0 $\pm$ 32,1	126,9 $\pm$ 19,8*

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

Ранее нами было установлено, что уровень АФК в эпидидимальной жировой ткани крыс с диет-индуцированным МС в 1,4 раза превышал значение в контрольной группе животных. Тогда как концентрация GSH в жировой ткани крыс с экспериментальным МС статистически значимо снижалась в 1,5 раза по сравнению с аналогичным показателем у крыс контрольной группы.

При анализе взаимосвязи между различными физиологическими, биохимическими показателями и содержанием H_2S в сыворотке крови и жировой ткани обнаружено, что концентрация глюкозы, инсулина, лептина, АФК, масса висцеральной жировой ткани

отрицательно коррелировали с уровнем H_2S в сыворотке крови и/или H_2S в жировой ткани. Напротив, повышение содержания GSH в адипоцитах было связано с увеличением H_2S в сыворотке крови и клетках жировой ткани (таблица 2).

Таблица 2

*Корреляции между биохимическими показателями, массой жировой ткани
и уровнем H_2S при экспериментальном МС*

Параметр	H_2S в сыворотке крови, мкМ	H_2S в жировой ткани, нмоль/мг белка
Глюкоза, мМ	-0,55*	-0,62*
Инсулин, пМ	-0,42*	-0,32
Лептин, нг/мл	-0,56*	-0,36
АФК, усл. ед.	-0,49*	-0,63*
GSH, нмоль/мг белка	0,45*	0,43*
Масса жировой ткани, г	-0,31	-0,43*

* $p < 0,05$.

Согласно имеющимся литературным данным [5, 8] газомедиатор H_2S вовлечен в регуляцию инсулин-зависимого поглощения глюкозы жировой тканью. Однако сведения разнятся, сообщается как о стимуляции, так и о торможении. Известно, что при гипергликемии H_2S может ингибировать транспортер глюкозы ГЛЮТ-4, стимулировать липолиз жировой ткани, также H_2S участвует в выработке адипокинов и воспалении. Так, введение животным экзогенных доноров H_2S на фоне кормления высокофруктозной диетой способствовало понижению продукции лептина адипоцитами [5]. В нашей работе показано, что снижение уровня H_2S в сыворотке крови и в жировой ткани коррелировало с повышением АФК и уменьшением концентрации GSH. Вероятно, на фоне повышенной прооксидантной активности жировой ткани реализуется восстановительный потенциал H_2S , который связан с реакциями образования персульфидов (RSSH) и связыванием АФК.

Заключение

Несмотря на всестороннее изучение влияния H_2S на регуляцию различных клеточных функций, данные о его роли в патофизиологии МС только начинают раскрываться. Метаболические и гемодинамические нарушения, возникающие при ожирении и МС, несомненно, оказывают свое влияние на мембранные и молекулярные механизмы действия H_2S на клетки-мишени. Существующая противоречивость данных о роли H_2S -продуцирующей системы при МС делает его перспективной мишенью для исследований.

Список литературы

1. Kolluru G.K. Gasotransmitter Heterocellular Signaling // Antioxid. Redox Signal. – 2017. – Vol. 26. – P. 936–960.
2. Hendriks K.D. Gasotransmitters in Health and Disease: A Mitochondria-Centered View // Curr. Opin. Pharmacol. – 2019. – Vol. 45. – P. 87–93.
3. Nagpure B.V. Learning, and Memory: Role of H_2S in Neurodegenerative Diseases // Handb. Exp. Pharmacol. – 2015. – Vol. 230. – P. 193–215.
4. Liu Y.H. Hydrogen Sulfide in the Mammalian Cardiovascular System // Antioxid. Redox Signal. – 2012. – Vol. 17. – P. 141–185.
5. Bełtowski J., Wiórkowski K. Role of Hydrogen Sulfide and Polysulfides in the Regulation of Lipolysis in the Adipose Tissue: Possible Implications for the Pathogenesis of Metabolic Syndrome // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23(3) – P. 1346.
6. Li L. Hydrogen sulfide is a novel mediator of endotoxic shock // FASEB J. – 2005. – Vol. 19. – P. 1196–1198.

7. Mok Y.Y.P. Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis // British journal of pharmacology. – 2004. – Vol. 143. – N. 7. – P. 881.
8. Comas F., Moreno-Navarrete J.M. The Impact of H₂S on Obesity-Associated Metabolic Disturbances // Antioxidants. – 2021 – Vol. 10(5). – P. 633.

УДК 616.895.8:575.174.015.3

**Полиморфизмы генов протеинкиназных сигнальных путей
у больных шизофренией**

А.С. Бойко, Д.Р. Биктимиров, Д.А. Петкун

Научный руководитель: профессор, д.м.н., С.А. Иванова

Научно-исследовательский институт психического здоровья Томского национального
исследовательского медицинского центра Российской академии наук,

Россия, г. Томск, ул. Алеутская, 4, 634014

E-mail: anastasya-iv@yandex.ru

Gene polymorphisms of proteinkinase signaling pathways in schizophrenia patients

A.S. Boiko, D.R. Biktimirov, D.A. Petkun

Scientific Supervisor: Prof., Dr., S.A. Ivanova

Mental Health Research Institute, Russia, Tomsk, Aleutskaya str., 4, 634014

E-mail: anastasya-iv@yandex.ru

Abstract. Schizophrenia is a chronic endogenous mental disorder with unknown etiology and pathogenesis, which is classified as a socially significant disease due to its high prevalence, progression and severity of social consequences. The purpose of the research is to study polymorphic variants of genes encoding the main signaling proteins involved in neuroplasticity processes. A clinical and biological examination of 430 patients with schizophrenia (F20 according to ICD-10) was carried out. A group of 189 healthy individuals matched by sex and age was examined as a control. Genotyping of 8 polymorphic variants of 4 genes (GSK3 β (rs13321783, rs6805251, rs334558), AKT1 (rs1130233, rs3730358), MAPK (rs8136867, rs3810608), CREB1 (rs6740584) was carried out using PCR-RT. Significant associations were identified for polymorphic variants of the GSK3 β and AKT1 genes. There is a higher frequency of the genotype AG and a decreased frequency of the genotype GG of the polymorphism rs334558 (gene GSK3 β) in patients with schizophrenia. Associations with schizophrenia were identified for two polymorphic variants of the AKT1 gene (rs3730358 and rs1130233). Our results support that changes in AKT1-GSK3 β signaling play an important role in the pathogenesis of schizophrenia, and we can consider AKT1 and GSK3 β as potential susceptibility genes for schizophrenia.

Key words: schizophrenia, gene polymorphism, proteinkinase signaling pathways, GSK3 β , AKT1, MAPK, CREB1

Введение

Шизофрения – хроническое эндогенное психическое расстройство, которое относится к социально значимым заболеваниям в связи с высокой распространенностью, прогрессивностью и тяжестью социальных последствий. Несмотря на многолетние исследования в области нейробиологии, этиология и патогенез шизофрении остаются недостаточно изученными.

Активно развивающимся в последнее время направлением в области клинической и фундаментальной медицины является изучение функционирования регуляторных белков основных сигнальных путей, которые вовлечены в каскады молекулярных процессов роста и дифференцировки нейронов, синаптической передачи, механизмы апоптоза и выживаемости клеток при психической патологии [1, 2]. Получены убедительные данные, демонстрирующие, что дисрегуляция внутриклеточных сигнальных путей играет важную роль в патогенезе шизофрении [3–5]. Ряд внутриклеточных белков, такие как протеинкиназы АКТ, MAPK и GSK3 β , транскрипционный фактор CREB являются ключевыми звеньями основных сигнальных путей и участвуют в каскадах реализации нейропластических процессов, нарушение которых приводит к когнитивному дефициту при шизофрении [6].

Особенностью настоящего исследования является оценка частот полиморфных вариантов генов, функционально объединенных в интерактивную сеть и регулирующих сигнальный путь от взаимодействия мозгового нейротрофического фактора с рецепторами клеточной мембраны (через активацию ряда внутриклеточных сигнальных молекул) до ядерного транскрипционного фактора.

Цель исследования: изучить полиморфизмы генов, кодирующих основные сигнальные белки, участвующие в процессах нейропластичности (гены *AKT1*, *MAPK*, *GSK3 β* , *CREB1*).

Материалы и методы исследования

Проведено комплексное клинико-биологическое обследование 430 больных шизофренией (F20 согласно МКБ-10), находящихся на лечении в клиниках НИИ психического здоровья Томского НИМЦ и Томской областной клинической психиатрической больницы. В качестве контрольной группы обследовано 189 здоровых лиц (без диагностированных психических расстройств). Исследование проведено в соответствии с протоколом, одобренным Биоэтическим комитетом НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. При формировании исследуемых групп была учтена этническая принадлежность (русские), а также отсутствие кровного родства между участниками.

ДНК получали стандартным фенол-хлороформным методом. Генотипирование 8 полиморфных вариантов 4 генов (*GSK3 β* (rs13321783, rs6805251, rs334558), *AKT1* (rs1130233, rs3730358), *MAPK* (rs8136867, rs3810608), *CREB1* (rs6740584) проводилось методом ПЦР в реальном времени на амплификаторах StepOnePlus Real-Time PCR System и QuantStudio 3D Digital PCR System (Applied Biosystems, США) (ЦКП «Медицинская геномика», Томский НИМЦ).

Статистическую обработку данных проводили с использованием ПО SPSS (версия 23 для Windows) и скриптового языка программирования R 3.6.1 в среде RStudio (v.1.2.5001) с использованием специальных пакетов. Модифицированный критерий хи-квадрат (χ^2) использовался для проверки соответствия распределения частот генотипов и аллелей исследуемых генов распределению Харди-Вайнберга (РХВ). Сравнение частот аллелей и генотипов двух групп осуществляли критерием Фишера. Для оценки ассоциации разных генотипов рассчитывались показатели отношения шансов с 95 % доверительным интервалом (odds ratio (OR), 95 % CI). Критический уровень значимости составил 0,05.

Результаты и обсуждение

Общая выборка обследуемых пациентов включала 430 больных шизофренией, из них 206 женщин и 223 мужчины. Возраст пациентов на момент включения в исследование составил 38 [31; 48] лет, возраст дебюта шизофрении – 23 [19,5; 30] года и длительность заболевания – 13 [6; 21] лет. Контрольная группа была сопоставима по полу и возрасту.

В результате проведенного статистического анализа были выявлены значимые ассоциации для полиморфных вариантов генов *GSK3 β* и *AKT1*. У больных шизофренией наблюдается более высокая частота встречаемости генотипа AG и снижение частоты встречаемости генотипа GG полиморфизма rs334558 гена *GSK3 β* ($\chi^2 = 13,116$, $p = 0,001$). Носительство гетерозиготного генотипа повышает риск развития шизофрении (OR = 2,17, 95 %CI: 1,22–3,88). У больных шизофренией выявлено снижение частоты встречаемости генотипа GG и повышение частоты генотипов AG и AA полиморфизма rs3730358 гена *AKT1* ($\chi^2 = 8,727$, $p = 0,013$). Гетерозиготный генотип и аллель А повышают вероятность развития шизофрении (OR = 2,02, 95 %CI: 1,2–3,41 и OR = 1,9, 95 %CI: 1,22–2,96), в то время как генотип GG и аллель G оказывают протективное действие (OR = 0,49, 95 %CI: 0,3–0,8 и OR = 0,53, 95 %CI: 0,34–0,82). Аналогичные результаты продемонстрированы для аллелей полиморфизма rs1130233 гена *AKT1* ($\chi^2 = 6,293$, $p = 0,012$): аллель Т оказывает рискованный эффект относительно шизофрении (OR = 1,48, 95 %CI: 1,09–2,02), аллель С снижает вероятность развития заболевания (OR = 0,67, 95 %CI: 0,5–0,92).

Таким образом, в представленной работе получены новые данные относительно

ассоциаций полиморфизмов генов протеинкиназных сигнальных путей с развитием шизофрении. Полиморфные варианты генов *AKT1* и *GSK3B* ассоциированы с шизофренией, при этом не было выявлено значимых различий при анализе частот полиморфных вариантов генов, кодируемых митоген-активируемую протеинкину *MAPK* и транскрипционный фактор *CREB1*, в группах больных шизофренией и психически здоровых лиц.

Ассоциированные однонуклеотидные полиморфизмы гена *AKT1* являются функциональными (проявляется более низкими уровнями белка АКТ1), что предполагает нарушение экспрессии и/или процессинга мРНК [7]. Полиморфный вариант rs334558, локализованный в промоторе гена *GSK3β*, также известен как функциональный, поскольку определяет уровень экспрессии *GSK3β*, возможно, путем регуляции связывания фактора транскрипции с промотором [8].

Заключение

Наши результаты подтверждают предположение о том, что изменения в передаче сигналов АКТ1-GSK3β играют важную роль в патогенезе шизофрении, и мы можем рассматривать *AKT1* и *GSK3B* как потенциальные гены предрасположенности к шизофрении.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 23-75-10072 «BDNF-опосредованные внутриклеточные сигнальные каскады в клиническом полиморфизме и когнитивном дефиците при шизофрении».

Список литературы

1. Mohammadi A., Amooeian V.G., Rashidi E. Dysfunction in Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling Pathway and Susceptibility to Schizophrenia, Parkinson's and Alzheimer's Diseases // Current gene therapy. – 2018. – № 18(1). – P. 45–63.
2. Ivanova S.A., Losenkov I.S., Bokhan N.A. Role of glycogen synthase kinase-3B in the pathogenesis of mental disorders // S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry. – 2014. – Vol. 114, № 6. – P. 93–100.
3. Khan A., Zahid S., Hasan B., Asif A.R., Ahmed N. Mass Spectrometry based identification of site-specific proteomic alterations and potential pathways underlying the pathophysiology of schizophrenia // Molecular biology reports. – 2023. – № 50(6). – P. 4931–4943.
4. Levchenko A., Kanapin A., Samsonova A., Fedorenko O.Y., Kornetova E.G., Nurgaliev T., Mazo G.E., Semke A.V., Kibitov A.O., Bokhan N.A., Gainetdinov R.R., Ivanova S.A. A genome-wide association study identifies a gene network associated with paranoid schizophrenia and antipsychotics-induced tardive dyskinesia // Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry. – 2021. – № 105. – P. 110134.
5. Howell K.R., Law A.J. Neurodevelopmental concepts of schizophrenia in the genome-wide association era: AKT/mTOR signaling as a pathological mediator of genetic and environmental programming during development // Schizophrenia research. – 2020. – № 217. – P. 95–104.
6. Михалицкая Е.В., Левчук Л.А. Нейропластичность мозга: мозговой нейротрофический фактор и протеинкиназные сигнальные пути (обзор литературы) // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2022. – № 3(116). – С. 44–53.
7. Emamian E.S., Hall D., Birnbaum M.J., Karayiorgou M., Gogos J.A. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3β signaling in schizophrenia // Nature genetics. – 2004. – № 36(2). – P. 131–137.
8. Kwok J.B., Hallupp M., Loy C.T., Chan D.K., Woo J., Mellick G.D., Buchanan D.D., Silburn P.A., Halliday G.M., Schofield P.R. GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease // Annals of neurology. – 2005. – № 58(6). – P. 829–839.

УДК 616-006.699

**Особенности фосфатаз DUSP1 и DUSP2 в иммунных клетках крови
в динамике проведения НАХТ у больных раком молочной железы**А.А. Будницкая¹, А.А. Фролова^{2,3}, П.С. Ямшиков^{2,3}

Научный руководитель: к.м.н., М.Р. Патышева

¹Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050²Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050³Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук,
Россия, г. Томск, пер. Кооперативный 5, 34009E-mail: arina.budnitskaya@gmail.com**Characteristics of DUSP1 and DUSP2 phosphatases
in circulation immune cells during NACT in breast cancer patients**A.A. Budnitskaya¹, A.A. Frolova^{2,3}, P.S. Iamshchikov^{2,3}

Scientific Supervisor: PhD., M.R. Patysheva

¹Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovsky trakt, 2, 634050²Tomsk State University, Tomsk, Russia, Lenina str., 36, 634050³Cancer Research Institute, Russia, Tomsk, Kooperativny 5, 34009E-mail: arina.budnitskaya@gmail.com

Abstract. The high regulatory potential of the immune system against cancer may be achieved through the operation of dual-specificity phosphatases (DUSPs) that exert negative regulation of MAPK signalling. Peripheral blood was collected from two breast cancer (BC) patients with an opposing response to neoadjuvant chemotherapy (NACT) to detect changes in DUSP1 and DUSP2 gene expression in immune blood cells. After obtaining cell populations, the dynamics of changes in the expression of these genes were analysed. A trend towards increased expression of DUSP1 and DUSP2 genes in immune cells of the patient who had no response to NACT was observed. This suggested a regulatory role of DUSP in the response to ongoing chemotherapy, which requires further study.

Key words: DUSP, breast cancer, immune system, chemotherapy

Введение

На настоящий момент существуют сведения о разностороннем участии иммунной системы в патогенезе рака молочной железы (РМЖ). Врожденный и адаптивный иммунитет обладает способностью к реализации противоопухолевого ответа, что подтверждается связью особенностей лейкоцитов с эффективностью лечения. Реализация хронического воспаления вносит вклад в активность иммунной системы и способствует прогрессии РМЖ у больных [1]. Таким образом, высокий регуляторный потенциал иммунной системы может влиять на адаптацию организма к условиям злокачественного роста, проводимого противоопухолевого лечения и химиотерапии в частности. Одним из механизмов, регулирующих тип иммунного ответа, является дефосфорилирование протеинкиназ, осуществляемое фосфатазами двойной специфичности (DUSP). Это семейство представлено несколькими изоформами, обнаруженными как в покоящихся, так и в активированных иммунных клетках. Они различаются между собой по субстратной специфичности, тканевому распределению, субклеточной локализации и режимам их индуцирования внеклеточными стимулами. Проведенные исследования установили, что большинство DUSP негативно регулируют MAPK-сигнализацию, связанную с апоптозом, пролиферацией, дифференцировкой и

трансформацией клеток, а также реакциями на стресс и воспаление [2]. Целью работы явилось изучение взаимосвязи динамики изменения генов *DUSP1* и *DUSP2* в иммунных клетках больных РМЖ с особенностями ответа на неоадьювантную химиотерапию.

Материалы и методы исследования

Чтобы определить картину системного иммунного ответа, индуцированного неоадьювантной химиотерапией (НАХТ), у пациенток с ранней стадией трижды негативного рака молочной железы собрали периферическую кровь до, через 3 и 21 день после НАХТ. Далее получали образцы мононуклеарных клеток периферической крови и выполняли анализ транскриптома единичных клеток с помощью технологии BD Rhapsody (BD Biosciences, США) на основании таргетной панели Immune Response. При этом у первой пациентки наблюдалась полная морфологическая регрессия в ответ на проведение НАХТ, в то время как у второй НАХТ была не эффективной. После стандартной обработки данных и процедур контроля качества были получены транскриптомные профили 82 473 клеток. Изменения экспрессии генов *DUSP1* и *DUSP2* в иммунных клетках в динамике проведения и в зависимости от эффективности НАХТ детектировали с помощью пакета программ DeSeq2 и расширения Limma.

Результаты

Согласно данным биоинформатического анализа среди мононуклеаров крови пациенток были получены 15 популяций иммунных клеток, среди которых кластеры Т- и В-лимфоцитов, натуральных киллеров, моноцитов и дендритных клеток. Динамика изменений экспрессии генов *DUSP1* и *DUSP2* была проанализирована в каждой популяции (Таблица 1, 2). У пациентки, ответившей на НАХТ, экспрессия гена *DUSP1* на протяжении лечения изменялась только в популяции моноцитов CD14⁺. У пациентки, не ответившей на НАХТ, экспрессия гена *DUSP1* возрастала во всех клетках в ходе терапии, кроме В-клеток памяти (Таблица 1). В случае пациентки, ответившей на НАХТ, наблюдалось снижение экспрессии гена *DUSP2* при проведении химиотерапии в популяциях Т-клеток памяти, наивных CCR7⁺, TRBC2⁺ Т-клеток, наивных CD8⁺ Т-клеток и моноцитов CD14⁺ S100A8hi. В то время как у пациентки, не ответившей на НАХТ уровень транскриптов повышался во всех популяциях, кроме В-клеток памяти, моноцитов CD14⁺ MHC2hi, CD14⁺ S100A8hi, CD16⁺ и gdT-клеток (Таблица 2). Динамика изменения экспрессии генов при сравнении двух пациенток между собой для *DUSP1* показала уровень статистической значимости adj.P.Val < 0,05 во всех клетках, кроме В-клеток памяти и CD14⁺ моноцитов MHC2hi, для *DUSP2* – в наивных и Т-клетках памяти, врожденных CD8⁺ Т-клетках, CD14⁺ моноцитах S100A8hi и Treg-клетках.

Таблица 1

Динамика изменения экспрессии *DUSP1* в анализируемых популяциях

Популяции		Пациентка, ответившая на НАХТ			Пациентка, не ответившая на НАХТ			Ур. знач. adj.P.Val
		FoldChange e 1 → 2	FoldChange 2 → 3	adj.P. Val	FoldChange 1 → 2	FoldChange 2 → 3	adj.P.Val	
В-кл. памяти		-0,12725	-0,65905	1	1,477617	0,976734	1,462E-07	0,073065
Наивные В-кл.		2,87661	-1,70493	1	0,30792	3,48549	1,929E-27	3,45E-08
Т-кл. памяти		-0,2814	0,032051	1	0,26306	2,289634	1,5E-100	8,03E-33
Наив. Т-кл.	CCR7 ⁺ , TRBC2 ⁺	-0,11278	-0,02453	1	-0,3986	3,823289	1,1E-173	3,10E-56
	CCR7 ⁺ , LEF ⁺	-0,17597	-0,24772	1	0,19668	3,588326	1,99E-175	1,04E-63
	CD8 ⁺	-0,30155	-0,44245	1	-0,36403	3,85034	2,28E-78	1,28E-23
Врожденные CD8 ⁺ Т-кл.		-0,24737	0,466285	1	-0,9368	2,91507	7,1E-128	7,39E-16

Цитотоксич. CD8+ Т-кл.	0,39827	-0,04716	1	-1,04768	2,64883	1,72E-92	5,18E-21
Моноциты	CD14+ MHC2hi	0,12665	0,25584	0,015 85	-0,1540	0,72159	8,635E-42
	CD14+ S100A8hi	0,42902	0,18536	5,73E -06	-0,911	1,44809	2,11E-54
	CD16+	-0,35993	0,407436	1	0,07757	1,24761	8,3E-10
gdT-клетки	0,64882	-0,35104	1	-0,13348	2,73401	5,24E-70	1,68E-11
MAIT-клетки	-0,23404	-0,56271	1	-0,30189	2,1529	2E-17	8,09E-11
NK-клетки	-0,19064	0,17578	1	-0,77547	2,51391	6,931E-82	1,13E-16
Treg-клетки	0,041532	-0,28688	1	0,025408	2,81338	7,894E-74	1,72E-31

*уровень статистической значимости $adj.P.Val < 0,05$

Таблица 2

Динамика изменения экспрессии *DUSP2* в анализируемых популяциях

Популяции	Пациентка, ответившая на НАХТ			Пациентка, не ответившая на НАХТ			Ур. знач. $adj.P.Val$
	FoldChange e 1 → 2	FoldChange 2 → 3	$adj.P.Val$	FoldChange 1 → 2	FoldChange 2 → 3	$adj.P.Val$	
В-кл. памяти	-1,01657	-0,47452	1	0,583424	0,760351	1	1
Наивные В-кл.	0,316278	0,039844	1	-0,09159	1,507600311	5,71E-07	1
Т-кл. памяти	0,331941	-1,08013	0,013	-0,61358	1,789633	4,01E-22	3,11E-18
Наив. Т-	0,34965	-1,2825	-0,17	1,250541	2,54718E-12	1,38E-12	3,10E-56
	CCR7+, LEF+	0,189933	-0,94494	0,6552 46	-0,48149	1,851212	1,20E-21
	CD8+	1,052376	-2,80098	9E-07	-0,47064	2,562187	2,85E-25
Врожденные CD8+ Т-кл.	-0,11698	-0,20261	1	-0,99331	0,949041	7,7E-15	0,000987
Цитотоксич. CD8+ Т-кл.	0,146367	-0,39679	1	-1,14141	0,34877	5,8E-07	0,605055
Моноциты	CD14+ MHC2hi	1,19695	-1,4112	1	-0,9765	0,8232	1
	CD14+ S100A8hi	1,858005	-1,80765	0,0002	-0,74222	0,342113	1
	CD16+	-0,85632	0,224936	1	0,175265	-1,03818	1
gdT-клетки	0,223624	-0,37976	1	-1,04922	0,819661	0,165001	1
MAIT-клетки	-0,13446	-0,4808	1	-1,91618	1,696894	0,003592	0,096756
NK-клетки	-0,22853	0,14559	1	-1,37496	0,83705	3,25E-08	0,718037
Treg-клетки	0,498078	-1,10167	0,2882	-0,4606	1,751892	1,96E-08	7,68E-08

*уровень статистической значимости $adj.P.Val < 0,05$

Заключение

В зависимости от эффективности НАХТ динамика экспрессии генов *DUSP1* и *DUSP2* в ходе проведения НАХТ в иммунных клетках крови отличается. При этом у пациентки, ответившей на НАХТ, экспрессия генов *DUSP1* и *DUSP2* не изменялась или снижалась в процессе химиотерапевтического лечения, в то время как у не ответившей пациентки экспрессия этих генов повышалась в подавляющем большинстве клеток.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №22-75-10128.

Список литературы

1. Стахеева М.Н., Эйдензон Д., Слонимская Е.М., Кухарев Я.В., Гарбуков Е.Ю., Бабышкина Н.Н., Чердынцева Н.В. Взаимосвязь состояния иммунной системы как интегрированного целого с клиническим течением рака молочной железы // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – Т. 2, № 44. – С. 11–19.
2. Lang, R., Raffi F.A.M. Dual-specificity phosphatases in immunity and infection: an update // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20, № 11. – P. 2710.

УДК 631.873.3

Выделение и поддержание культуры *Rhodomonas sp.*

И.Д. Волобуев

Научный руководитель: к.б.н. И.В. Рудский

Национальный исследовательский университет ИТМО, Университет ИТМО

Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49, литер А, 197101

E-mail: igor_volobuev2001@mail.ru

Isolation and maintenance of the *Rhodomonas sp.* culture

I.D. Volobuev

Scientific Supervisor: PhD., I.V. Rudsky

ITMO University, Russia, St. Petersburg, Kronverksky str., 49, letter A

E-mail: igor_volobuev2001@mail.ru

Abstract. *Microalgae are highly relevant in the modern world. They are widely used as feed objects in aquaculture or sources of biologically active substances such as phycoerythrin and so on. In this work, the aim was to isolate one of the species of marine phytoplankton and create a monoculture based on it. This can be useful both for creating collection and for sharing samples with other researchers in the future.*

Key words: *Rhodomonas, microalgae, phytoplankton, cultivation*

Введение

Создание и поддержание коллекций культур микроводорослей – полезная и весьма важная задача, позволяющая облегчить доступ к тем или иным штаммам и видам организмов и микроводорослей, в частности. Особенно ценно наличие тех видов, которые относительно легко поддерживать и культивировать в лабораторных условиях, имеющих уже изученные области применения или широкие перспективы для этого, а потому интересные в качестве объекта исследований большому количеству учёных. Именно поэтому выделение в устойчивую поддерживаемую культуру одного из доступных видов микроводорослей стало целью данной работы.

Для этого пришлось решить задачи по оптимизации процесса отбора каждого образца с колониями различных представителей фитопланктона, создать оптимальные условия обогрева и освещения. А дабы исключить возможность случайной контаминации при помощи помещения отобранных клеток в искусственно созданный на основе дистиллированной и стерилизованной воды аналог морской среды.

В дальнейшем, после проведения наблюдений за состоянием каждого из образцов, были выделены и изолированы представители рода *Rhodomonas sp.* широко применяемые человеком в различных областях, например, для получения фикоэритрина и фикоксантина [1] и аквакультуре в качестве кормового объекта, например, для копепод, ибо обладает высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), а также сочетанием докозагексаеновой кислоты (ДГК), необходимой для качественного функционирования мозга животного и эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК), являющейся одним из главных компонентов комплексных липидов. Было доказано, что представители рода *Rhodomonas* способствуют улучшению показателей роста, выживаемости, размножения и содержания липидов у веслоногих рачков, морских креветок и личинок гребешка. В свою очередь эти веслоногие рачки, морские креветки и личинки гребешка являются наиболее часто используемыми и самыми простыми для выращивания кормами для производства рыбы в аквакультуре [2].

Также после экстракции вышеупомянутых биологических макромолекул возможно их применение в биомедицинской, биотехнологической и нутрицевтической отраслях. [3]

Экспериментальная часть

Наилучшим для отбора фитопланктона был признан батометрический метод. [4] Однако, в связи с доступностью образцов морского фитопланктона в составе аквариумов и небольшого требуемого количества микроорганизмов, было решено обойтись пипеткой Пастера. В общей сумме с помощью неё и скребка было отобрано 7 проб, помещённых в чашки Петри под искусственное светодиодное освещение. Фотопериод составил 16:8, день:ночь соответственно.

Каждая проба помещалась в 20 мл искусственной морской воды (табл.1). По прошествии 3–5 дней в часть проб было добавлено удобрение в виде 20 мкл среды L1 Medium, служащей источником витамина B12, тиамин, биотин и таких важных макроэлементов как азот и фосфор [5]. Ещё через 5 дней с помощью светового микроскопа проходящего света Zeiss Axiolab A1 фиксировались результаты.

Таблица 1

Состав растворов для создания искусственной морской воды

Раствор А	Концентрация, г/л
NaCl	27,1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	6,95
MgCl ₂ · 6H ₂ O	5,1
KCl	0,68
NaHCO ₃	0,18
KBr	0,1
H ₃ BO ₃	0,024
Раствор Б	Концентрация г/л
CaCl ₂	1,2
SrCl ₂ · 6H ₂ O	0,024

Из всех отобранных видов наиболее жизнеспособными оказался один, определённый в дальнейшем как *Rhodomonas* sp. [6]. Наибольшую эффективность при очищении культуры от нежелательных видов показало увеличение концентрации удобрения в 100 раз до 2 мл. Такие условия являются вполне комфортными для представителей данного вида [7]. В то же время являясь экстремальными для большинства других, причём как флоры, так и фауны. Этот метод позволил относительно быстро получить большое количество клеток *Rhodomonas* sp. в изолированном виде. Колонии культивировались до концентраций клеток, удобных для дальнейшего отбора, что позволяло эффективно использовать методику последовательного разведения для очистки от нежелательных элементов и создания монокультуры (рис. 1).

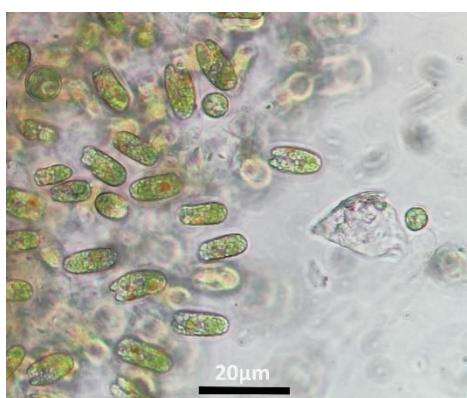


Рис. 1. *Rhodomonas* sp.

Результаты

Выделена устойчивая культура *Rhodomonas* sp. из числа прочих, довольно многочисленных, видов. При изначальной плотности посева примерно в 20 клеток на мл, в итоге она увеличилась до примерно 2000 на мл, хотя она и не стала равномерной по всему

объёму. Данный результат поддерживался при помощи внесения раз в 5 дней 20 мкл среды L1 Medium в качестве удобрения.

Это подтверждает, как возможность успешного выделения, так и перспективность такой культуры, являющейся источником ценного гидробионта, использовать которого можно уже сейчас, как для постановки опытов по подбору оптимальных условий среды, так и для культивирования с целью дальнейшего применения в роли кормового объекта для таких различных гидробионтов как мидии, устрицы, полипы, веслоногие рачки и др.

Кроме этого были выделены представители других таксонов морских одноклеточных водорослей, такие виды как *Dunaliella salina*, *Pleurosigma sp.*, *Pleurosigma elongatum* и *Amphora proteus*. Однако, на пути к их выделению были обнаружены некоторые сложности, такие как, низкая выживаемость в конкретной подобранной среде, сложность выделения из обильно выросших вокруг нитчатых водорослей, служащих одновременно защитой от зоопланктона, неспособность выдержать конкуренцию с более приспособленными видами, такими как описанные выше.

Заключение

В дальнейшем планируется модернизация состава среды под каждую полученную монокультуру посредством одновременного добавления образцов из ёмкости с устойчивым количеством водорослей в пробирки с различными концентрациями некоторых микро и макроэлементов с целью выявления оптимального состава для представителей каждого полученного вида.

Список литературы

1. Cerino F., Zingone A. A survey of cryptomonad diversity and seasonality at a coastal Mediterranean site // European Journal of Phycology – 2006. – Vol. 15, № 41:4. – P.363–378.
2. Seixas P., Coutinho P., Ferreira M., Otero A. Nutritional value of the cryptophyte *Rhodomonas lensfor* *Artemia* sp. // J Exp Mar Bio Ecol – 2009. – № 381. – P. 1–9
3. Christos L., Jasper van H., Timmermans Klaas R. The Effect of Nitrogen Starvation on Biomass Yield and Biochemical Constituents of *Rhodomonas* sp. // Frontiers in Marine Science – 2020. – Vol. 7. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2020.563333>
4. Вассер С.П., Кондратьева Н.В., Масюк Н.П. и др. Водоросли. Справочник: – Киев: Наук. думка, 1989. – 608 с.
5. L1 Medium // Cyanobacteria Growth Media Recipes: сайт. – 2024. – URL: <https://www-cyanosite.bio.purdue.edu/media/table/media.html>
6. WoRMS. World Register of Marine Species // Реестр: сайт. – 2024. – URL: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=106316>
7. Latsos, C., van Houcke, J., Blommaert, L. et al. Effect of light quality and quantity on productivity and phycoerythrin concentration in the cryptophyte *Rhodomonas* sp. // Journal of applied phycology – 2021. – № 33. – P. 729–7411.

УДК: 535.8

**Исследование спектральных характеристик выдыхаемого воздуха пациентов
с депрессией с помощью анализа соответствующих спектров поглощения**А.П. Вотинцев

Научный руководитель: доцент, к.ф.-м.н., А.В. Борисов
Национальный исследовательский Томский государственный университет
Россия, г. Томск, пр. Ленина 36, 634050
E-mail: valeksei001100@gmail.com

**Investigation of the spectral characteristics of exhaled air in patients with depression by
analyzing the corresponding absorption spectra**A.P. Votintsev

Scientific Supervisor: Ass. Prof., PhD. A.V. Borisov
Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050
E-mail: valeksei001100@gmail.com

Abstract. *In this work, the study of the absorption spectra of exhaled air in patients with depressive disorder was carried out. The absorption spectra of exhaled air were obtained using a photoacoustic spectrometer LaserGasAnalyser-III. The separation of the exhaled air absorption spectra of patients with depressive disorder from the control group was obtained using the principal component analysis.*
Key words: *depressive disorder; photoacoustic spectroscopy, principal component analysis.*

Введение

Депрессивное расстройство (ДР) – психическое расстройство, характеризующееся стойким снижением настроения, двигательной и умственной активности, а также снижением или потерей способности получать удовольствие (ангедонией) [1].

По данным Всемирной организации здравоохранения ДР является одним из наиболее распространенных психических заболеваний, затрагивающих более 300 миллионов человек всех возрастных групп [2].

Стандартные методы диагностики, основанные на опросниках [3] и беседах психиатра с пациентом, имеют низкую точность при выявлении ДР на ранних стадиях заболевания [4]. Поэтому необходимы количественные методы, которые увеличат точность диагностики.

Количественными методами диагностики ДР являются анализ крови и слюны на наличие биомаркеров [5, 6] и нейровизуализация [7]. Данные методы являются либо инвазивными, либо дорогостоящими, либо требуют дополнительной пробоподготовки, и их не целесообразно применять для многократной диагностики, чтобы отследить развитие болезни.

Анализ выдыхаемых газов, которые не требует дополнительной обработки, является неинвазивным методом исследования. Выдыхаемый газ содержит летучие органические соединения (ЛОС), которые выдыхаются вскоре после их образования и, таким образом, могут передавать информацию о психическом состоянии человека [8].

В данной работе предлагается выявить различия между спектрами поглощения выдыхаемого воздуха пациентов с ДР и контрольной группы методом фотоакустической спектроскопии.

Экспериментальная часть

Измерения спектров поглощения выдыхаемого воздуха проводились на фотоакустическом спектрометре LaserGasAnalyser-III (ООО «Специальные технологии», г. Новосибирск), который предназначен для измерения спектра поглощения газовой пробы в диапазоне (9,166 – 10,935) мкм, соответствующего линиям генерации CO₂-лазера. На рисунке представлено изображение схемы спектрометра LaserGasAnalyser-III.

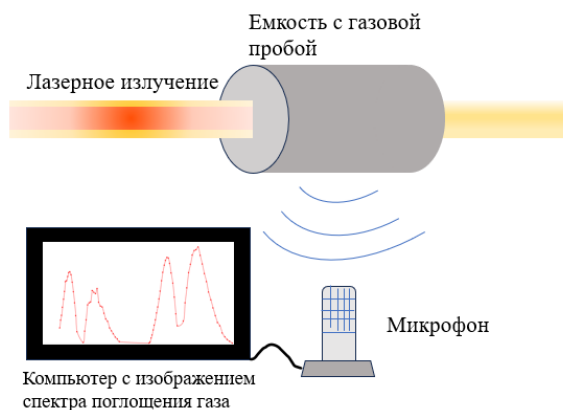


Рис. 1. Блок-схема газоанализатора LaserGasAnalyser-III

Принцип действия прибора основан на фотоакустическом эффекте – эффекте поглощения электромагнитного излучения газообразным пробным веществом.

Импульсы излучения лазера направляются в оптико-акустическую ячейку, где излучение поглощается пробой. В результате поглощения, во время импульса газ нагревается и, как следствие, расширяется, после окончания импульса излучения нагрев прекращается. Таким образом возникает акустическая волна, амплитуда которой зависит от коэффициента поглощения пробой излучения на данной длине волны. Возникшая акустическая волна воспринимается микрофонами оптико-акустической ячейки, полученный электрический сигнал затем усиливается, оцифровывается и обрабатывается при помощи платы управления и обработки сигналов.

Результат измерения поглощения на установленной длине волны (длина генерации лазера) передается в программное обеспечение, затем лазер перестраивается для генерации излучения на следующей длине волны, измерение повторяется.

Полученные коэффициенты поглощения формируют спектр поглощения пробного вещества – зависимость коэффициента поглощения от длины волны излучения, измеренный спектр поглощения выводится на экран программного обеспечения в рабочем окне.

Для изучения спектров поглощения выдыхаемого воздуха пациентов с ДР исследуются три группы: здоровые, пациенты с униполярной депрессией F.32 (код согласно МКБ-10), пациенты с биполярной депрессией F.31 (БАР). Выбираются доноры без сопутствующих заболеваний и вредных привычек. Каждая группа содержит 20 образцов, 30 % выборки – мужчины, 70 % выборки – женщины, средний возраст 45 ± 5 лет. Набор проб выдыхаемого воздуха осуществлялся на базе НИИ Психического здоровья. Данное исследование было согласовано с этическим комитетом.

Результаты

В данной работе были получены спектры поглощения выдыхаемого воздуха для трех групп: здоровые, пациенты с УД и пациенты с БАР. Построены средние значения для спектров поглощения выдыхаемого воздуха. Для анализа спектров поглощения выдыхаемого воздуха применен метод главных компонент. Метод главных компонент (МГК) – один из основных способов уменьшения размерности данных с потерей минимального количества информации. При использовании МГК происходит замена исходных данных на значения в новом пространстве главных компонент. Объединяются наиболее важные (с точки зрения минимизации среднеквадратичной ошибки) значений в меньшее количество параметров, но более информативных (уменьшение размерности пространства данных).

На рисунке 2а изображены средние значения для спектров поглощения каждой исследуемой группы и среднеквадратичные отклонения, на рисунке 2б показано разделение

спектров поглощения выдыхаемого воздуха исследуемых групп с помощью МГК. На рисунке 2а видно, что среднеквадратичное отклонение велико, что не позволяет провести математическое разделение спектров поглощения трех исследуемых групп в целом. С помощью МГК было выделено три главных компоненты, в пространстве которых контрольная группа (здоровые) группируются и отделяются от значений групп депрессивного расстройства. Данное разделение показывает, что в выдыхаемом воздухе пациентов с депрессивным расстройством содержатся биомаркеры, которые влияют на спектры поглощения газа, что позволяет применить данный метод для диагностики депрессивных расстройств.

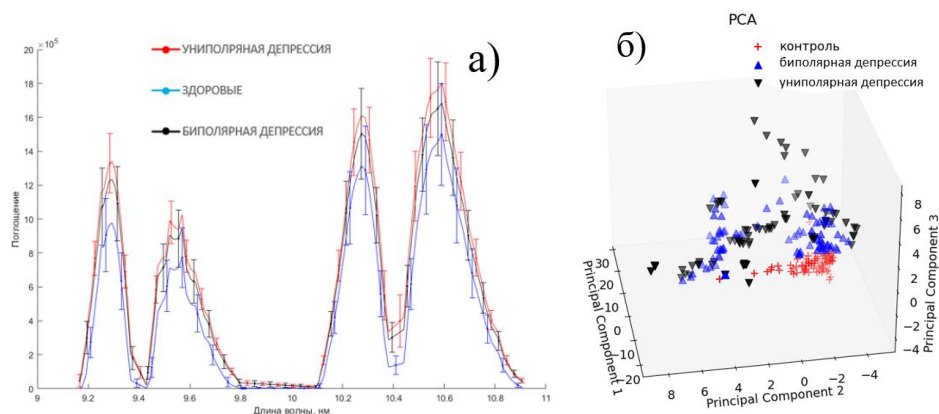


Рис. 2. Зависимость поглощения выдыхаемого воздуха от длины волны, полученные на LaserGasAnalyser-III (а), разделение спектров поглощения выдыхаемого воздуха с помощью МГК (б)

Заключение

В данной работе исследуется применение метода лазерного газового анализа для диагностики депрессивного расстройства на фотоакустическом спектрометре III. С помощью метода главных компонент получено разделения между группой пациентов с депрессивным расстройством и группой здоровых. Данная работа показывает, что метод исследования, основанный на лазерном газовом анализе, может быть применен для подтверждения диагноза депрессивного расстройства.

Список литературы

1. Borozdenko D.A. et al. Modeling depression // Medical Journal of the Russian Federation. – 2019. – Vol. 25, № 3. – P. 176–180.
2. Депрессивное расстройство (депрессия) // Всемирная организация здравоохранения (сайт). – 2024. – URL: <https://www.who.int/ru>.
3. Montgomery S.A., Åsberg M. A. New Depression Scale Designed to be Sensitive to Change // British Journal of Psychiatry. – 1979. – Vol. 134, № 4. – P. 382–389.
4. Grunze H. et al. Clinical Relevance and Treatment Possibilities of Bipolar Rapid Cycling // Neuropsychobiology. – 2002. – Vol. 45, № Suppl. 1. – P. 20–26.
5. Le-Niculescu H. et al. Precision medicine for mood disorders: objective assessment, risk prediction, pharmacogenomics, and repurposed drugs // Mol Psychiatry. – 2021. – Vol. 26, № 7. – P. 2776–2804.
6. Cui Y. et al. Stimulated Parotid Saliva Is a Better Method for Depression Prediction // Biomedicines. – 2022. – Vol. 10, № 9. – P. 2220.
7. Korgaonkar M.S. et al. Amygdala Activation and Connectivity to Emotional Processing Distinguishes Asymptomatic Patients With Bipolar Disorders and Unipolar Depression // Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging. – 2019. – Vol. 4, № 4. – P. 361–370.
8. Lueno M. et al. Volatile Organic Compounds From Breath Differ Between Patients With Major Depression and Healthy Controls // Front Psychiatry. – 2022. – Vol. 13.

УДК: 616-006-036.17-091.818:576.3

Роль энтоза в росте и прогрессировании опухоли

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

Научный руководитель: Н.В. Литвяков

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального
исследовательского медицинского центра Российской академии наук»,

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

E-mail: xenia.gaptulbarova@yandex.ru

The role of entosis in tumor growth and progression

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

Scientific Supervisor: N.V. Litvyakov

Research Institute of Oncology, Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634009

E-mail: xenia.gaptulbarova@yandex.ru

Abstract. *In modern oncology to this day, the question of the main obstacles to cancer treatment associated with tumor progression after chemotherapy and radiotherapy is still acute. These mechanisms are still actively studied by the scientific community. Thus, in 2007, Overholtzer M. et al. described a new process of non-apoptotic cell death in human tumors triggered by the loss of matrix adhesion [1]. Subsequently, they proposed a new term for this event, known today as "entosis". Entosis itself is a process of active penetration of a living cell (internalized) into neighboring cells of the same type, with the involvement of adhesion molecules, forming the very cell-in-cell (CIC) structures. Chemotherapy has been shown to be one of the important triggers of entosis between tumor cells. We hypothesize that under the influence of chemotherapy, due to the mechanism of entosis and cell fusion, fusion of both the genetic material of internalized and engulfing cells may be observed. In the process, aneuploidy in host cells may occur, in particular, the appearance of amplifications of stemness genes, dramatically affecting the risk of metastasis.*

Key words: *entosis, cell-in-cell, nonapoptotic cell death.*

Введение

В современной онкологии по сей день остро стоит вопрос об основных препятствиях лечения рака, связанных с прогрессированием опухоли после химио- и радиотерапии. Данные механизмы до сих пор активно изучаются научным сообществом. Так, в 2007 году Overholtzer M. et al. описали новый процесс неапоптотической клеточной гибели в опухоли человека, запускающийся потерей матричной адгезии [1]. Впоследствии, ими был предложен новый термин данного события, известный сегодня, как «энтоз». Сам энтоз представляет собой процесс активного проникновения живой клетки (интернализируются) в соседние клетки того же типа, с вовлечением молекул адгезии, формируя те самые структуры «cell-in-cell» (CIC). Показано, что одним из важных триггеров энтоза между опухолевыми клетками является химиотерапия. Мы предполагаем, что под действием химиотерапии, за счёт механизма энтоза и слияния клеток может наблюдаться слияние и генетического материала интернализированной и поглощающих клеток. В процессе этого может возникать анеуплоидия в клетках-хозяевах, в частности, появление амплификаций генов стволовости, драматически влияющих на риск метастазирования.

Материалы и методы исследования

В исследование включены 64 пациента больных колоректальным раком в возрасте от 32 до 88 лет с морфологически верифицированным диагнозом.

Для изучения CNA использована микроматрица высокой плотности CytoScan HD Array (Affymetrix, USA). Проводилось гистологическое исследование на предмет наличия и частоты

энтоза в срезах. Частота встречаемости энтоза сравнивалась с количеством амплификаций генов стволовости, основными клинико-морфологическими параметрами больных (стадия, размер опухоли, степень дифференцировки, Grade). Статистическая обработка данных проведена с использованием пакетов прикладных программ «Statistica 8» (StatSoft Inc., USA).

Результаты

Нами были проанализированы гистологические препараты от 64 пациентов больных колоректальным раком (КРР) с морфологически верифицированным диагнозом (рис. 1).

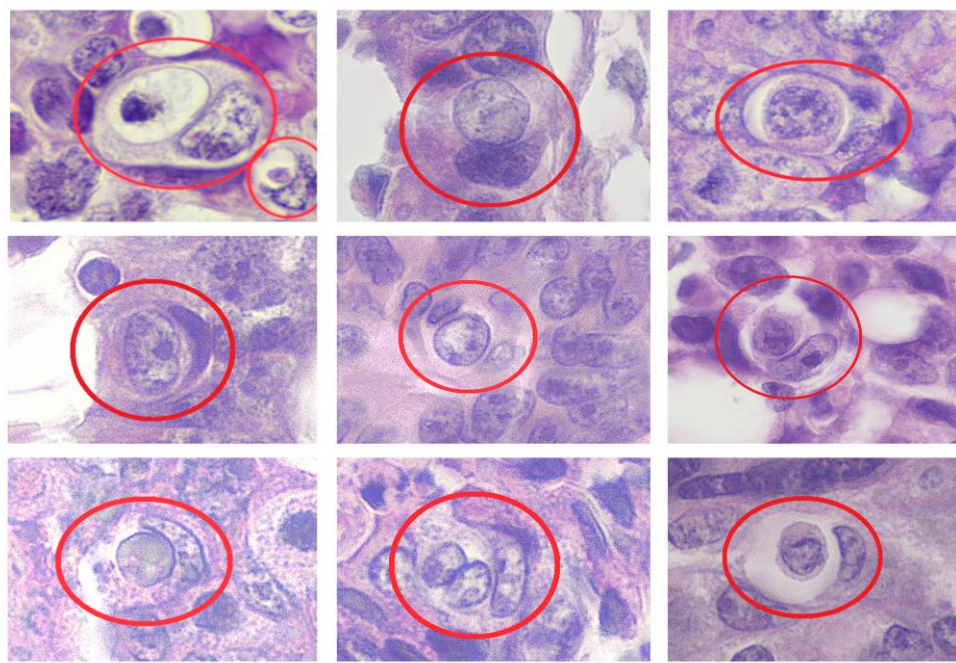


Рис. 1. Энтоз в образцах больных КРР. Ядра внешних клеток имеют серповидную форму и оттеснены к периферии клетки. Увеличение: 600X. Окраска: Г/Э

Структуры энтотических СИС определяли на срезах, покрашенных Г/Э, с помощью критериев Маккея: выраженная цитоплазма клетки-хозяина (победителя или поглощающей клетки), ядро клетки-хозяина (обычно серповидной формы, бинуклеарное или мультилобулярное и прижатое к цитоплазматической стенке), промежуточное вакуолярное пространство, окружающее интернализированную клетку (проигравшую), цитоплазма интернализированной клетки и ядро интернализированной клетки (часто круглой формы и расположенное центрально или акцентрически).

После чего мы посмотрели связь частоты энтотических событий с основными клинико-морфологическими параметрами пациентов: размером опухоли, стадией, степенью дифференцировки, Grade. В результате анализа было установлено, что частота энтотических событий практически не связана с клинико-морфологическими параметрами. Статистически значимые результаты были получены только для размера опухоли ($p = 0,03$), указывающие, что частота структур СИС была выше в опухолях T4, в равнении с группой T2-3, соответственно.

Оценивалась прогностическая значимость структур СИС. Была подсчитана общая выживаемость пациентов в зависимости от частоты энтоических событий (рис. 2). Данный анализ не показал статистически значимых результатов, но указал на положительную тенденцию.

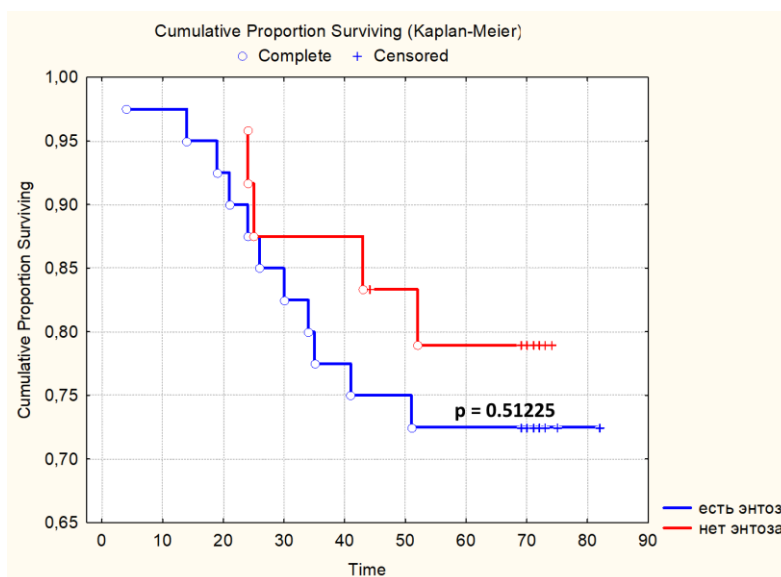


Рис. 2. Общая выживаемость для больных КРР в зависимости от частоты энтоических событий

Корреляционный анализ 49 больных КРР показал зависимость количества аппликаций генов стволовости от частоты образованных структур СИС. Чем больше энтоических структур было обнаружено в ткани, тем больше наблюдалось амплификаций генов стволовости, коэффициент корреляции Спирмена 0,47 ($p = 0.0006$), которые связаны со способностью опухолевых клеток к метастазированию.

Заключение

Частота СИС не связана с основными клинико-патологическими параметрами заболевания, статистически значимой оказалась зависимость только с размером опухоли, с повышением которого увеличивается частота энтоза.

Установлена прямая корреляционная связь (коэффициент корреляции Спирмена 0,47 ($p = 0.0006$)) частоты энтоза с количеством амплификаций генов стволовости, которые определяют способность опухолевых клеток к метастазированию [2, 3].

Исследование энтоза будет продолжено, так как оно может дать ключ к пониманию механизма быстрого развития анеуплоидных субпопуляций опухолевых клеток в процессе химиотерапии и прогрессирования опухолей.

Список литературы

1. Overholtzer M. et al. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion // Cell. – 2007. – Vol. 131, № 5. – P. 966–979.
2. Litviakov N.V. et al. Neoadjuvant Chemotherapy Induces the Appearance of New Copy Number Aberrations in Breast Tumor and is Associated with Metastasis // Current cancer drug targets. – 2020. – Vol. 20, № 9. – P. 681–688.
3. Litviakov N.V. et al. Amplifications of Stemness Gene Loci–New Markers for the Determination of the Need for Neoadjuvant Chemotherapy for Patients with Breast Cancer. A Prospective Study // Journal of Personalized Medicine. – 2021. – Vol. 11, № 5. – P. 397.

УДК 615.2, 615.21

**Анальгетическая активность производного 2H-хромена
на модели нейропатической боли у мышей****Н.В. Гуркин^{1,2}, В.В. Быков^{1,2}, И.В. Ильина³**Научный руководитель: профессор, д.м.н., заслуженный работник ВШ РФ А.И. Венгеровский¹¹ Сибирский государственный медицинский университет
Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050² ООО «Инновационные фармакологические разработки»
Россия, г. Томск, ул. Елизаровых, 79/4, 634021³ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН
Россия, г. Новосибирск, пр-кт Академика Лаврентьева, 9, 630090E-mail: nvgurkin@yandex.ru**The analgesic activity of a 2H-chromene derivative on a model of neuropathic pain in mice****N.V Gurkin^{1,2}, V.V. Bykov^{1,2}, I.V. Il'ina³**Scientific Supervisor: Prof., Dr., A.I. Vengerovskii¹¹ Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, ul. Moskovskii trakt, 2, 634050² Innovative Pharmacology Research LLC, Russia, Tomsk, ul. Elizarovyykh, 79/4, 634021³ Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
Russia, Novosibirsk, Lavrentjev Av., 9, 630090E-mail: nvgurkin@yandex.ru

Abstract. The analgesic effect of the 2H-chromene derivative CHR was investigated on a model of neuropathic pain induced by the ligation of the sciatic nerve in mice. From the 5th to the 7th day of the experiment, the analgesic effect of the CHR compound was not weaker than that of the comparison drug. Based on the computational data, we assume that the CHR compound is an allosteric modulator of the cannabinoid CB₁ receptor.

Key words: analgesic effect, neuropathic pain, 2H-chromene.

Введение

Нейропатическая боль возникает в результате повреждения центрального или периферического отделов соматосенсорной нервной системы и причиняет страдания 7–10 % населения [1]. Препаратами первой линии при нейропатической боли служат противосудорожные средства и антидепрессанты, второй линии – опиоидные анальгетики [2]. Использование этих средств купирует боль, улучшает состояние у 30–50 % больных и сопряжено с развитием побочных эффектов в виде лекарственной зависимости, эйфории, головокружения и сонливости [3]. Перспективным подходом в анальгетической терапии нейропатической боли является разработка аллостерических модуляторов каннабиноидных рецепторов первого типа. Модуляторы повышают аффинитет эндогенных каннабиноидов к рецепторам за счет связывания с аллостерическим участком и оказывают анальгетический эффект, при этом не проявляют психотропного действия и не вызывают лекарственную зависимость [3]. Разрабатываемый анальгетик, обозначенный шифром CHR, действует через активацию эндоканнабиноидной системы и по данным молекулярного докинга имеет сродство к аллостерическому участку каннабиноидного рецептора первого типа. Представляет интерес изучить анальгетическую активность соединения CHR на модели нейропатической боли.

Цель настоящей работы – изучить анальгетическую активность производного 2H-хромена CHR на модели нейропатической боли, вызванной перевязкой седалищного нерва у мышей.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили на 15 белых мышах стока CD-1 массой тела 31 ± 3 г. Животных содержали в барьерном виварии в пластиковых клетках по 5 особей при температуре 18–26 °С, относительной влажности воздуха 45–65 %, воздухообмене 10–11 об/ч и регулируемом световом режиме (12:12 ч). Исследование одобрено этическими комитетами Сибирского государственного медицинского университета (протокол 20/23 от 08.12.2023) и ООО «Ифар» (протокол 127/2022 от 14.02.2022).

Животных наркотизировали внутривенным введением пропофола (ЗАО «Бинергия», Россия) в дозе 1,5 мг/кг. Нейропатическую боль моделировали тугой перевязкой викриловой нитью правого седалищного нерва в области трифуркации [4]. В течение 7 дней после операции мышам однократно в желудок вводили соединение CHR в эффективной анальгетической дозе 5 мг/кг или адьювантный анальгетик габапентин (ЗАО «Канонфарма продакшн», Россия) в дозе 100 мг/кг. Доза вещества CHR установлена по результатам ранее проведенных поисковых исследований, доза габапентина выбрана на основании данных литературы [5]. Животные контрольной группы получали растворитель этих веществ – 2 % водный раствор твин-80 (NeoFroxx GmbH, Германия). На протяжении всего эксперимента ежедневно через 1 ч после каждого введения оценивали болевую чувствительность с помощью нитей Фрея.

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 8.0. Нормальность распределения данных оценивали критерием Шапиро–Уилка. Данные не подчинялись закону нормального распределения. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью критерия Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением критерием Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,017$.

Результаты

На 1-е сут эксперимента соединение CHR повышало порог болевой чувствительности на 17 % ($p > 0,017$), препарат габапентина – на 77 % ($p < 0,017$) в сравнении с показателем контрольной группы. Начиная со вторых суток тактильная аллодиния уменьшалась на 54 % при введении производного 2H-хромена CHR ($p > 0,017$) и на 73 % при введении анальгетика габапентина ($p < 0,017$). С 5-го по 7-й день эксперимента анальгетический эффект соединения CHR был не слабее, чем действие препарата сравнения ($p > 0,017$, рис. 1). Максимальный анальгетический эффект при введении вещества CHR в дозе 5 мг/кг проявлялся на 6-е сут и составлял 62 % относительно показателя контроля ($p < 0,017$).

Вероятно, анальгетическая активность производного 2H-хромена CHR на модели нейропатической боли связана с действием на каннабиноидные рецепторы первого типа. Введение антагониста каннабиноидных CB₁-рецепторов римонабанта приводило к полному исчезновению анальгетического эффекта соединения CHR, при этом результаты эксперимента *in vitro* свидетельствуют о том, что исследуемая молекула прямо не действует на сайт связывания каннабиноидных CB₁- и CB₂-рецепторов, не влияет на ферменты инактивации эндогенных каннабиноидов [6].

Значение энергии связывания соединения CHR, полученное методом компьютерного моделирования в программе AutoDock (Scripps Research Institute, США), сопоставимо со значением референсного лиганда аллостерического участка CB₁-рецептора вещества Org 27569. Предполагается, что производное 2H-хромена CHR – аллостерический модулятор каннабиноидного CB₁-рецептора.

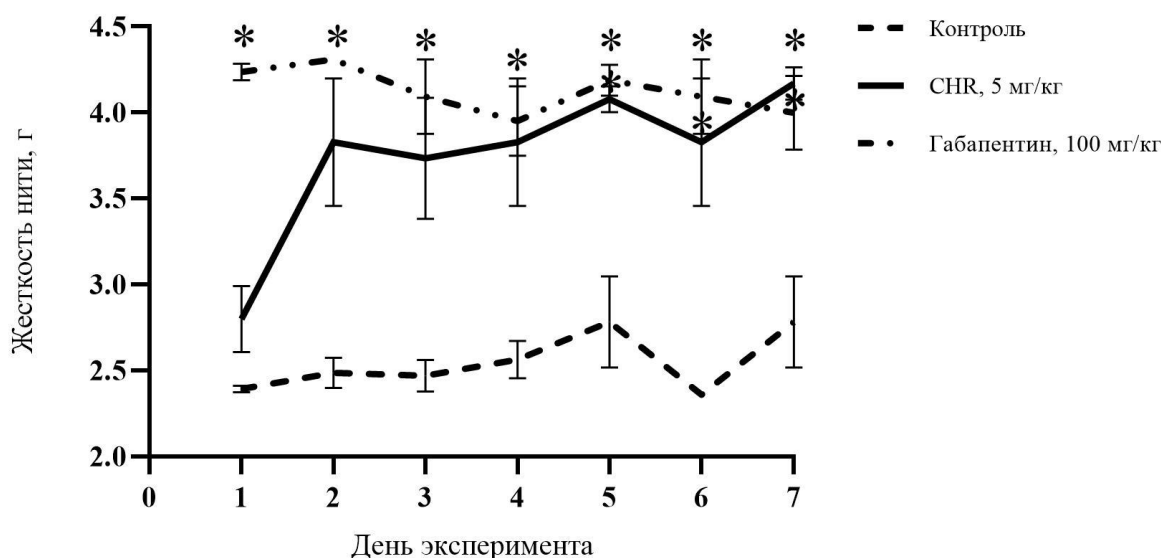


Рис. 1. Динамика аллодинии

* различия с показателем контроля, $p < 0,017$

Заключение

Предполагаемый модулятор СВ₁-рецепторов CHR в эффективной дозе 5 мг/кг оказывает анальгетическое действие на модели нейропатической боли, сопоставимое с эффектом адьювантного анальгетика габапентина.

Список литературы

1. Neuropathic pain / L. Colloca, T. Ludman, D. Bouhassira et al // Nat Rev Dis Primers. – 2017. – Vol. 3, № 17002. – P. 1–20.
2. Рубрикатор клинических рекомендаций Минздрава России: официальный сайт. Хронический болевой синдром (ХБС) у взрослых пациентов, нуждающихся в паллиативной медицинской помощи. – Москва, 2023. – URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/400_2.
3. Zhu C., Lan X., Wei Z., Yu J., Zhang, J. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors as a novel therapeutic strategy in neuropathic pain // Acta Pharm Sin B. – 2024. – Vol. 14, № 1. – P. 67–86.
4. Торопкина Ю.Е., Романенко Ю.В., Налетова Д.А., Алексеев В.В., Овсянников В.Г., Алексеева Н.С., Кривохлябов И.П., Попивненко М.Д. Лабораторные модели нейропатической боли: обзор и практические рекомендации // Российский журнал боли. – 2023. – Т. 21, № 2. – С. 38–49.
5. Abdel-Salam O.M., Sleem A.A. Study of the analgesic, anti-inflammatory, and gastric effects of gabapentin // Drug Discov Ther. – 2009. – Vol. 3, № 1. – P. 18–26.
6. Li-Zhulanov N.S., Il'ina I.V., Chicca A., Schenker P., Patrusheva O.S., Nazimova E.V., Korchagina D.V., Krasavin M., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F. Effect of chiral polyhydrochromenes on cannabinoid system // Med. Chem. Res. – 2019. – Vol. 28, № 4. – P. 450–464.

УДК 577.218:57.086.835

Генетически модифицированная клеточная линия с гиперэкспрессией гена MYC

Д.С. Долгашева^{1,2}, Е.В. Сухинина^{3,4}, Е.А. Кравцова^{1,2}

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

¹НИИ онкологии, Томский НИМЦ,

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

²Национальный исследовательский Томский государственный университет

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

³Центр биологических исследований и биоинженерии, СГМУ

Россия, г. Томск, Московский тракт 2, 634050

⁴Научно-исследовательская школа химической и биомедицинской инженерии,

Национальный исследовательский Томский политехнический университет

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

E-mail: normikus.18.97@gmail.com

Genetically modified cell line with MYC gene hyperexpression

D.S. Dolgasheva^{1,2}, E.V. Sukhinina^{3,4}, E.A. Kravtsova^{1,2}

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

¹Tomsk Cancer Research Institute, Russia, Tomsk, Kooperativny str., 5, 634050

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

³Center of Bioscience and Bioengineering, Russia, Tomsk, Moskovsky trakt, 2, 634050

⁴Research School of Chemical and Biomedical Engineering, Russia, Tomsk, Lenina str., 30, 634050

E-mail: normikus.18.97@gmail.com

Abstract. We have previously shown that cell lines carrying amplifications of two or more stemness genes are capable of dedifferentiation with the formation of mammospheres. The BT549 cell line has amplification of only one stemness gene, KLF5, and is incapable of dedifferentiation. In the present study, a monoclonal breast cancer cell line BT-549_Myc9 with increased expression of MYC gene was established by CRISPR/SAM activation. BT-549_Myc9 cells showed an increased proliferation rate in vitro. MYC gene overexpression led to an increase in the CD44 + CD24 stem cell fraction and an increase in the number and diameter of mammospheres formed by BT-549_Myc9 cells. This effect was enhanced by IL6 stimulation. We hypothesized that MYC gene activation increases cancer cell plasticity and facilitates cell dedifferentiation, namely, facilitates the transition of a differentiated cancer cell into a stem cell.

Key words: MYC gene, CRISPR-based synergistic activation mediator, breast cancer cell, dedifferentiation.

Введение

Известно, что ген MYC связан со стволовостью, а его aberrантная экспрессия ассоциирована с неконтролируемым ростом и делением клеток. Так повышенная экспрессия MYC наблюдается более чем в 70 % случаев онкологических заболеваний [1]. Как правило, MYC участвует в канцерогенезе совместно с другими онкогенами, однако точный механизм его участия в прогрессировании опухоли не установлен. Ранее мы показали, что клеточные линии, несущие амплификации двух и более генов стволовости, способны дедифференцироваться с образованием маммосфер. С помощью метода CRISPR/Cas9 SAM-активации была получена генетически модифицированная клеточная линия BT549_Myc9 с гиперэкспрессией гена MYC. Согласно нашей гипотезе, ген MYC играет ключевую роль в пластичности опухолевых клеток. А именно, активация MYC помогает опухолевым клеткам сохранять свою пластичность и способность к дедифференцировке. Таким образом, целью

настоящей работы явилась оценка способности клеток BT-549_Myc9 с SAM-активированной экспрессией гена *MYC* к дедифференцировке и образованию маммосфер.

Материалы и методы исследования

В работе использовали опухолевые клеточные линии BT-549 и 293T. Клетки выращивали в стандартных условиях в полной среде DMEM/F12, дополненной 10 % FBS, 1 % GlutaMax. Клоны клеток BT-549 с повышенной экспрессией гена *MYC* получали с помощью системы Synergistic Activation Mediator (SAM) на основе CRISPR.

На первом этапе получали клетки BT-549 со стабильной экспрессией компонентов для активации SAM. Для клонирования использовали 5× буфер для лигирования Quick (Евроген), 10× буфер для лигирования T4 (Евроген), BsmBI (Thermo Scientific), лигазу T7 и полинуклеотидкиназу T4 (NEB, Англия). Плазмиды выделяли набором Plasmid Miniprep (Евроген). Для размножения векторов компетентные клетки *Escherichia coli* Stbl3 трансформировали методом теплового шока в присутствии CaCl₂. Лентивирусные векторы получали путем трансфекции 293T с помощью Metafectene (Biontex, Германия). Далее смесью лентивирусных векторов трансдуцировали клетки BT-549 со стабильной экспрессией компонентов SAM. Селекцию проводили в течение 14 дней. Моноклональные клеточные линии получали методом серийных разведений.

Тотальную РНК выделяли набором RNeasy Mini Kit Plus (Qiagen, Германия). Для изучения экспрессии с-Мус проводили иммунофлуоресцентный анализ и Вестерн-блот-анализ. Отбор целевых клеток осуществляли на сортировщике SH800 (Sony, США). Количественное определение уровня экспрессии *MYC* проводили методом Taq-man ПЦР на приборе RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия). Транскриптомный анализ экспрессии генов проводили на микрочипах Clariom S Assays. Профиль экспрессии маркеров клеточной поверхности определяли на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter, США). Анализ пролиферации проводили методом окрашивания белка сульфородамино В (SRB). Способность модифицированной линии инициировать вторичный рост опухоли изучали методом формирования маммосферы. Также способность клеток индуцировать рост опухоли была изучена на модели ксенотрансплантата *in vivo*.

Результаты

Было получено четыре клон клеток BT549 с гиперэкспрессией гена *MYC*. По данным RTqPCR, клон BT-549_Myc9 показал самый высокий уровень экспрессии гена *MYC* среди других (в 3 и более раза выше, чем в клетках дикого типа). Вестерн-блот и иммунофлуоресцентный анализы также показали повышенный уровень белка в модифицированной линии (рис. 1).

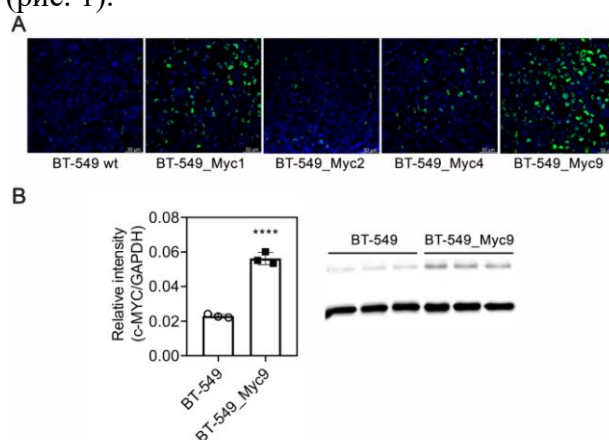


Рис. 1. Анализ экспрессии с-Мус в моноклональных клеточных линиях BT-549 wt и BT-549 после SAM-активации гена *MYC*. Примечание: (А) Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии с- Мус; (В) Вестерн-блот-анализ экспрессии с- Мус

Активация *MYC* привела к увеличению скорости пролиферации клеток в 1,2 раза – время удвоения уменьшилось с 2, 3 суток для клеток дикого типа, и до 2 суток для модифицированной линии (рис. 2 А).

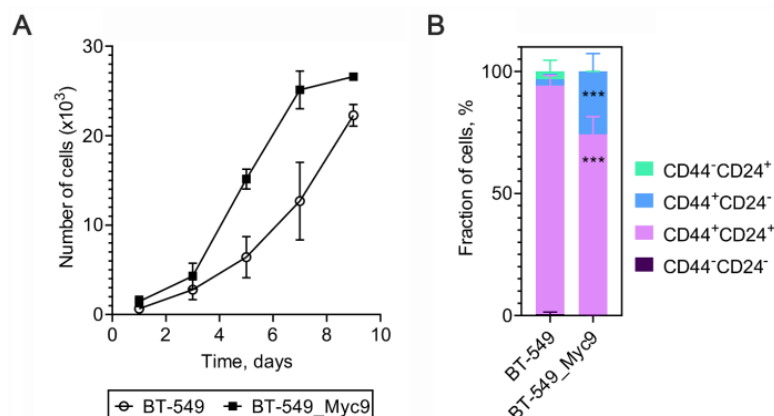


Рис. 2. Сравнительная характеристика моноклональной клеточной линии BT-549_Myc9.

Примечание: (А) Скорость пролиферации клеточных линий BT-549 wt и BT-549_Myc9; (В) Профиль поверхностной экспрессии BT-549 wt и BT-549_Myc9. Данные представлены как среднее $\pm$ SD. $n=3$, * $p<0,05$

Анализ субпопуляционного состава показал, что клетки дикого типа BT-549 преимущественно являются прогениторными (CD44⁺CD24⁺) (93,5 $\pm$ 4,1 %). После SAM-активации гена *MYC* доля клеток CD44⁺CD24⁺ снизилась до 74,2 $\pm$ 7,2 %, а доля CD44⁺CD24⁻, соответствующих опухолевым стволовым клеткам, увеличилась с 2,7 $\pm$ 1,9 % до 25,8 $\pm$ 7,3 %. При этом у линии BT-549_Myc9 клетки CD44⁻ практически отсутствовали (рис. 2 В).

Показано, что клетки BT-549_Myc9 имеют тенденцию к увеличению образования маммосфер в присутствии ИЛ6. Клетки CD44⁺CD24⁺, отсортированные из линии BT-549_Myc9, образуют больше маммосфер по сравнению с клетками CD44⁺CD24⁺ дикого типа. Стимуляция ИЛ6 приводит к образованию маммосфер большего диаметра клетками BT-549_Myc9, но не оказывает влияния на маммосферы клеток дикого типа. Отмечено, что маммосферы BT-549_Myc9 демонстрируют тенденцию к агрегации независимо от добавления ИЛ-6, что может быть связано с ключевой ролью *c-Myc* в клеточной адгезии.

Эксперимент на животных установил, что клетки BT-549_Myc9 могут индуцировать рост опухоли у мышей с иммунодефицитом и показали увеличение скорости роста опухоли по сравнению с родительскими клетками BT-549.

Заключение

В результате проведенных исследований с помощью системы CRISPR/SAM-активации была создана моноклональная клеточная линия опухоли молочной железы BT-549_Myc9 с усиленной экспрессией гена *MYC*. Клетки BT-549_Myc9 демонстрировали увеличение скорости пролиферации *in vitro*. Таким образом, сверхэкспрессия *MYC* в клетках опухоли молочной железы связана с увеличением субпопуляции опухолевых стволовых клеток, это способствует маммосферообразованию и росту опухоли, что подтвердило нашу гипотезу.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение от 29.09.2021 № 075-15-2021-1073.

Список литературы

1. Llombart V., Mansour M.R., Therapeutic targeting of "undruggable" *MYC* // EBioMedicine. – 2022. – V. 75. – P. 103756.

УДК 616-092.9

**Противоопухолевая активность магнитных наночастиц на основе оксида железа
с нанесенным на поверхность доксорубицином****Л.В. Ефимова, А.А. Сёмчина, К.В. Невская**

Научный руководитель: к.б.н. А.Г. Першина

Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России

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

E-mail: efimova.lina@gmail.com**Antitumor activity of iron oxide-based magnetic nanoparticles loaded with doxorubicin****L.V. Efimova, A.A. Syomchina, K.V. Nevskaya,**

Scientific Supervisor: PhD., A.G. Pershina

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

E-mail: efimova.lina@gmail.com

Abstract. The aim of this research was to investigate the antitumor activity of magnetic iron oxide nanoparticles loaded with doxorubicin (Fe_3O_4 -PEG-Dox). It was found that after three-time intratumoral injection of Fe_3O_4 -PEG-Dox nanoparticles at a dose of 0.3 mg per tumor, combined with alternating magnetic field (AMF) application 24 hours after each injection, resulted in inhibition of tumor growth. A decrease in cell proliferative activity and an increase in apoptosis were observed 48 hours after combined treatment with Fe_3O_4 -PEG-Dox and AMF compared to the control group.

Key words: magnetic nanoparticles, iron oxide, doxorubicin, magnetic field, tumor growth model.

Введение

Доксорубицин является эффективным противоопухолевым препаратом, назначаемым при терапии многих видов рака, в том числе рака молочной железы, толстой кишки и яичников, однако его использование может вызвать побочные эффекты, такие как повреждение клеток сердца, печени, почек, нервной системы и подавление функции костного мозга. Более того, возможны отдаленные эффекты в виде развития вторичных злокачественных опухолей [1, 2].

Одним из способов снижения токсичности доксорубицина при сохранении противоопухолевого эффекта является применение наноразмерных носителей на основе магнитных наночастиц оксида железа (МНЧ) [3]. Магнитные наночастицы способны накапливаться в тканях-мишенях, удерживая препарат в опухолевой ткани [4]. Дополнительно, способность МНЧ разогреваться при наложении переменного магнитного поля (ПМП) может быть использована для контролируемого высвобождения лекарственного средства с поверхности МНЧ [5].

Цель настоящей научно-исследовательской работы – изучить противоопухолевую активность МНЧ оксида железа, с сорбированным на поверхности доксорубицином при воздействии ПМП.

Экспериментальная часть

В работе использовали водные коллоидные растворы наночастиц, на основе Fe_3O_4 со средним диаметром 10 нм, модифицированные силоксановой оболочкой, полиэтиленгликолем, и содержащие доксорубицин (МНЧ-PEG-Dox). Частицы были получены и охарактеризованы в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского, Екатеринбург.

Исследование выполняли на экспериментальной модели рака молочной железы 4T1 у мышей линии Balb/C (n = 27).

МНЧ-PEG-Dox вводили животным внутриопухолево в дозе 0,3 мг на опухоль. Воздействие ПМП (27 мТл, 230 кГц) выполняли на приборе TOR Ultra HT (Наносистемы,

Тамбов). Измерение размера опухолевого узла проводили 2 раза в неделю и рассчитывали индекс торможения роста опухоли (ТРО). Для оценки влияния магнитных наночастиц на пролиферацию и апоптоз клеток в опухоли проводили иммуногистохимическую окраску с использованием антител к Ki67 (ab15580, Abcam) и Cleaved Caspase-3 (Asp175, Cell-Signaling). Гистологические исследования образцов проводили с помощью биологического микроскопа Leica DMi8 (Leica Microsystems CMS GmbH, Германия).

Результаты

Согласно данным о динамике изменения размеров опухолевого узла, применение схемы с трехкратным внутриопухолевым введением препарата доксорубицина и воздействием ПМП через 24 часа после каждого введения приводило к замедлению роста опухоли 4T1 по сравнению с контрольной группой. (Рисунок 1).

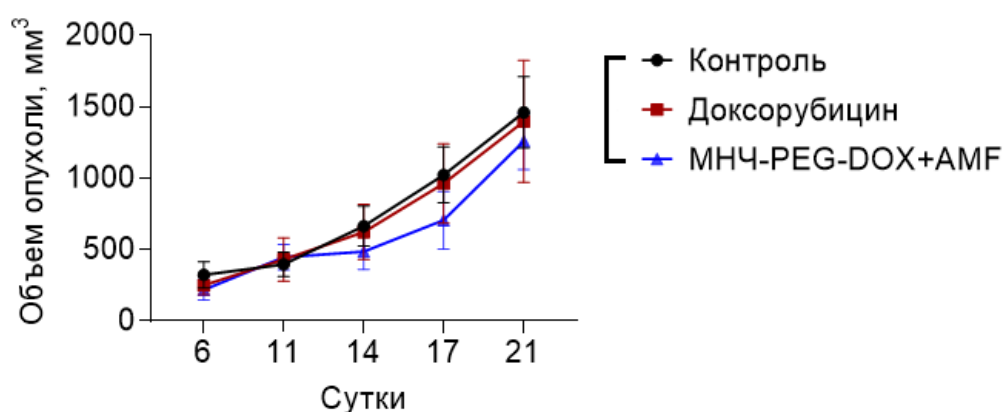


Рис. 1. Изменение размера опухоли 4T1 в группах BALB/c мышей. Контроль – интактная группа животных; Доксорубин – группа животных с внутриопухолевым введением доксорубина; МНЧ-PEG-Dox+AMF – группа животных с внутриопухолевым введением МНЧ-PEG-Dox и магнитной гипертермией. Данные представлены как Среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n=6$

Анализ срезов опухоли окрашенных антителами к Ki67 показал снижение пролиферативной активности в опухолях, извлеченных из животных с внутриопухолевым введением частиц МНЧ-PEG-Dox и воздействием магнитного поля при 27 мТл, 230 кГц в течение 60 минут через 24 часа после введения (Рисунок 2).

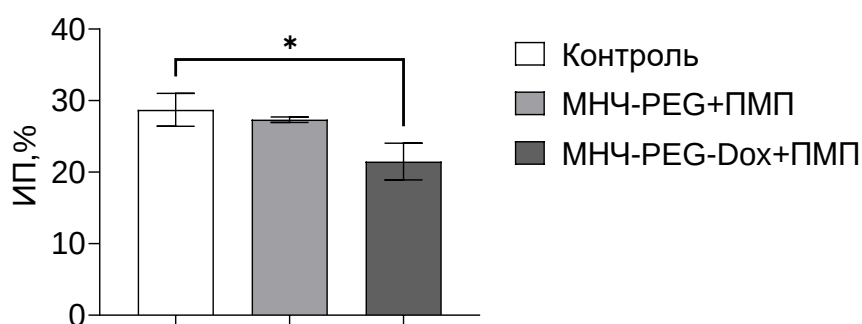


Рис. 2. Индекс пролиферативной активности (ИП) клеток в опухолях 4T1, извлеченных из животных экспериментальных групп. Контроль – интактная группа животных; МНЧ-PEG+ПМП – группа животных с однократным внутриопухолевым введением МНЧ-PEG и магнитной гипертермией через 24 часа после введения; МНЧ-PEG-Dox +ПМП – группа животных с однократным внутриопухолевым введением МНЧ-PEG-Dox и магнитной гипертермией через 24 часа после введения. Данные представлены как Среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n=3$.
* $p<0,05$ по сравнению с контрольной группой

Согласно данным оценки экспрессии классического маркера апоптоза – активной формы каспазы-3 – на срезах опухолей, в группах МНЧ-PEG+ПМП и МНЧ-PEG-Dox+ПМП наблюдали увеличение относительной площади иммунопозитивных (Caspase-3⁺) областей по сравнению с контрольной группой (Рисунок 3).

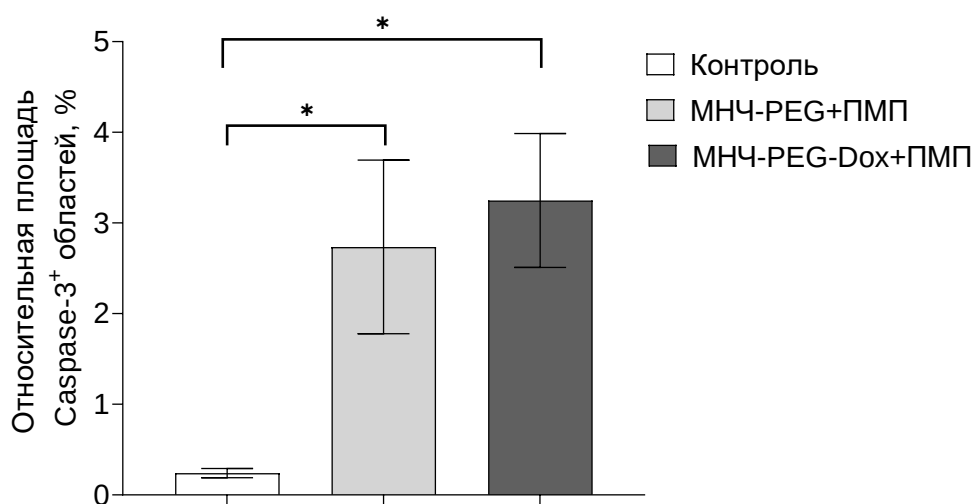


Рис. 3. Относительная площадь Caspase-3⁺ областей в опухолях 4T1, извлеченных из животных экспериментальных групп. Контроль – интактная группа животных; МНЧ-PEG+ПМП – группа животных с однократным внутриопухолевым введением МНЧ-PEG и магнитной гипертермией через 24 часа после введения; МНЧ-PEG-Dox +ПМП – группа животных с однократным внутриопухолевым введением МНЧ-PEG-Dox и магнитной гипертермией через 24 часа после введения.

Данные представлены как Среднее ± стандартное отклонение, n=3.

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

Заключение

Наночастицы МНЧ-PEG-Dox в комбинации с ПМП проявляют противоопухолевую активность, подавляют пролиферацию и усиливают апоптоз клеток опухоли 4T1 у мышей линии Balb/C.

Список литературы

1. Gorini S., De Angelis A., Berrino L. Malara N., Rosano G. et al. Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2018. – P. 1–15.
2. Basak D., Arrighi S., Darwiche Y., Deb S. Comparison of Anticancer Drug Toxicities: Paradigm Shift in Adverse Effect Profile // *Life (Basel)*. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 48–71.
3. Demin A M., Vakhrushev A.V., Pershina A.G., Valova M.S., Efimova L.V. et al. Magnetic-Responsive Doxorubicin-Containing Materials Based on Fe₃O₄ Nanoparticles with a SiO₂/PEG Shell and Study of Their Effects on Cancer Cell Lines // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 16. – P. 9093.
4. Lungu I., Nistorescu S., Badea M., Petre A., Udrea A. et al. Doxorubicin-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles Synthesized by Laser Pyrolysis: In Vitro Study on Human Breast Cancer Cells // *Polymers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12, № 12. – P. 2799–2811.
5. Bobde Y., Patel T., Paul M., Biswas S., Ghosh B. PEGylated N-(2 hydroxypropyl) methacrylamide polymeric micelles as nanocarriers for the delivery of doxorubicin in breast cancer // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2021. – Vol. 204. – P. 111833–111845.

УДК 616-002.951.22

Неоплазия холангиоцитов при экспериментальном описторхозе:

роль окислительных повреждений

О.Г. Запарина, А.В. Ковнер

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

Институт цитологии и генетики СО РАН

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

E-mail: zp.oksana.93@gmail.com

Biliary neoplasia in experimental opisthorchiasis: role of oxidative damage

O.G. Zaparina, A.V. Kovner

Scientific Supervisor: Dr., M.Yu. Pakharukova

Institute of cytology and genetics SB RAS, Russia, Novosibirsk, Pr. Lavrentyeva 10, 630090

E-mail: zp.oksana.93@gmail.com

Abstract. In the present study, we evaluated the level of biliary intraepithelial neoplasia in *Opisthorchis felinus*-infected hamsters after the treatment with mitochondrial-targeted antioxidant SkQ1. The *Opisthorchis felinus* infection causes chronic inflammation and biliary intraepithelial neoplasia. A direct relationship between the oxidative stress and biliary intraepithelial neoplasia has not been shown, however there is evidence that increased reactive oxygen species production is observed in liver flukes infection. Mitochondrial-targeted antioxidant SkQ1 significantly reduced the biliary neoplasia, which was accompanied by a decrease in lipid and DNA oxidation byproducts, mRNA expression and level of proteins associated with inflammation and fibrogenesis, and was also associated with an activation of Keap1-Nrf2 pathway. Thus, a direct relationship was found between the oxidative stress and the severity of biliary intraepithelial neoplasia in *O. felinus*-infected hamsters.

Key words: neoplasia, oxidative stress, liver fluke.

Введение

Трематода *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884) или кошачья двуустка, паразитирует в желчных протоках человека и рыбоядных млекопитающих и вызывает описторхоз [1]. Описторхоз сопровождается повреждением печени, включая формирование очагов хронического воспаления, развитием перидуктального фиброза, холангиофиброза, пролиферацией желчных протоков, а также развитием неоплазии эпителия желчных протоков (холангиоцитов) [2]. Неоплазию холангиоцитов относят к предшественникам холангиокарциномы - рака желчных протоков.

Имеются данные о том, что окислительный стресс вовлечен в патогенез описторхоза [3], однако прямой взаимосвязи между окислительными повреждениями и развитием неоплазии холангиоцитов ранее не было выявлено.

Целью данной работы было выявить взаимосвязь между содержанием маркеров окислительного стресса и уровнем неоплазии эпителия желчных протоков с помощью ингибиторного анализа, с применением митохондриально - направленного антиоксиданта SkQ1 на модели экспериментального описторхоза на золотистых хомячках *Mesocricetus auratus* через 1 и 3 месяца инфекции. SkQ1 (-10-(6'-Plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium)-митохондриально-направленный антиоксидант, состоящий из антиоксиданта пластохинона, липофильного катиона и декаметиленового линкера.

Экспериментальная часть

Двухмесячные самцы (*M. auratus*) были разделены на 8 групп по 5 животных (1 и 3 месяца инфекции): контрольная группа (неинфицированные животные); неинфицированные

животные, получавшие с пищей SkQ1 (1 мкмоль/кг); животные, инфицированные 75 метацеркариями *O. felinus*; животные, инфицированные *O. felinus* и получавшие SkQ1. Метацеркарии *O. felinus* были выделены из подкожных мышечных тканей зараженных рыб семейства Карповых (язь) из реки Обь.

Животных выводили из эксперимента и собирали образцы мочи для проведения ИФА анализа; образцы печени для гистологических, иммуногистохимических исследований, оценки уровней экспрессии провоспалительных (*Tnfa*, *Cd68*) и профибротических (*Ck7*, *Acta2*) генов с помощью ПЦР в режиме реального времени. Морфометрический анализ гистологических срезов печени после окраски гематоксилин-эозином и по Массону проводили в программе ImageJ 1.50i. С помощью Вестерн-блот анализа было оценено содержание белков NQO1 и NRF2 в культуре клеток HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека).

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения Statistica 6.0.с применением анализа ANOVA + post Hoc Tukey и метода Манна-Уитни.

Результаты

Выявлена прямая взаимосвязь площади неоплазии (площадь среза, занимаемая неопластическими изменениями) холангиоцитов и окислительных повреждений в печени. Было показано, что диета с антиоксидантом SkQ1 приводит к снижению неоплазии холангиоцитов, улучшает структурное состояние печени и снижает накопление продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида и 4-гидрокси-2-ноненаля) в печени инфицированных *Opisthorchis felinus* животных (Рис. 1). Кроме того, было продемонстрировано значимое снижение содержания 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (маркера окислительных повреждений ДНК) в крови животных. С помощью метода ОТ-ПЦР в печени было отмечено значимое снижение экспрессии мРНК генов, вовлеченных в процессы воспаления (*Tnfa*, *Cd68*) и фиброгенеза (*Ck7*, *Acta2*).

Было впервые показано, что действие SkQ1 может быть обусловлено за счёт активации сигнального пути Keap1/Nrf2/ARE. Активация Keap1/Nrf2/ARE была показана с помощью метода иммуногистохимии на срезах печени животных, получавших SkQ1, в частности при иммуноокрашивании экспрессия белков NQO1 и NRF2 была более выражена по сравнению со срезами печени животных, не получавшими SkQ1. С помощью Вестерн-блот анализа было продемонстрировано значимое увеличение содержания белков NQO1 и NRF2 в клетках HepG2, обработанных SkQ1 по сравнению с необработанными клетками.

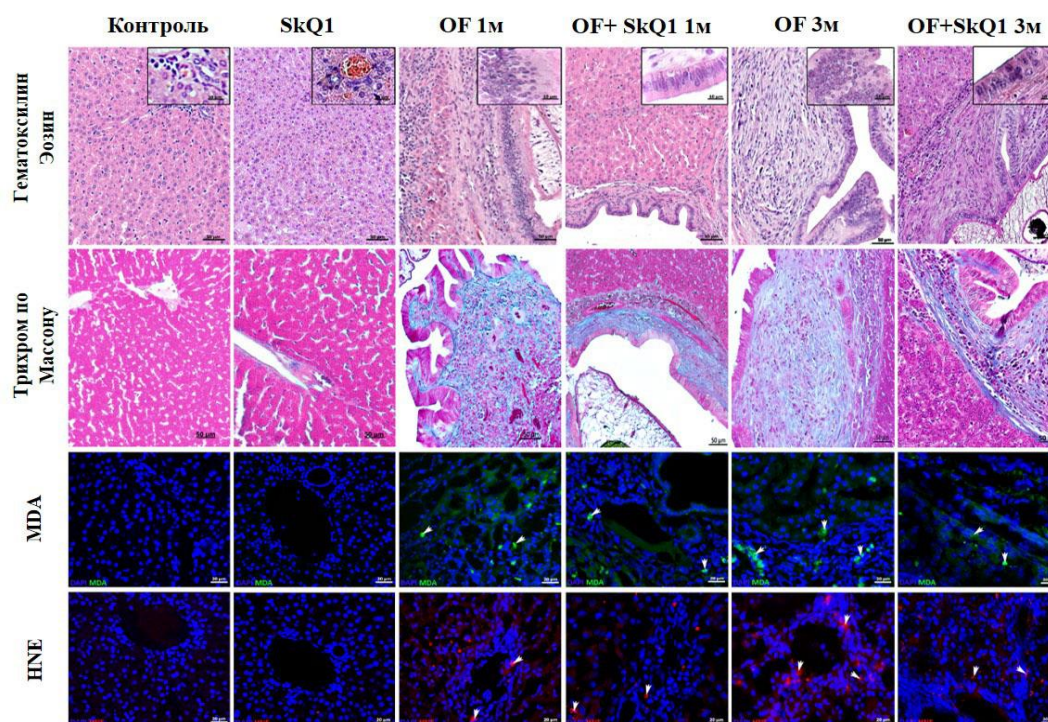


Рис. 1. Накопление маркеров перекисного окисления липидов MDA (малоновый диальдегид) и HNE (4-гидрокси-2-ноненаль) у неинфицированных и инфицированных *Opisthorchis felinus* золотистых хомячков через 1 и 3 месяца инфекции.

Специфический сигнал указан стрелками. OF-группа, инфицированная *O. felinus*; OF+ SkQ1-инфицированная группа, получавшая SkQ1

Заключение

Митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 снижал накопление маркеров окислительного стресса, уменьшал площадь неоплазии холангиоцитов и воспаления в клетках печени инфицированных *O. felinus* животных. Несмотря на то, что точные молекулярные механизмы развития неоплазии холангиоцитов неизвестны и требуют дальнейшего изучения, с помощью применения ингибитора (антиоксиданта) нам удалось показать, что окислительный стресс играет ключевую роль в этом процессе. Полученные результаты могут способствовать более полному пониманию механизмов, вызывающих патологические изменения при описторхозе, а также позволят рассмотреть возможность использования антиоксидантов в комбинаторной терапии гельминтозов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-00080.

Список литературы

1. Беэр С.А. Биология возбудителя описторхоза. – М.: Т-во научных изданий КМК, 2005. – 336 с.
2. Gouveia M.J., Pakharukova M.Y., Laha T., Sripa B., Maksimova G.A., Rinaldi G., Brindley P.J., Mordvinov V.A., Amaro T., Santos L.L., Correia da Costa J.M., Vale N. Infection with *Opisthorchis felinus* induces intraepithelial neoplasia of the biliary tract in a rodent model // Carcinogenesis. – 2017. – № 38. – P. 929–937.
3. Pakharukova M.Y., Zaporina O.G., Kapushchak Y.K., Baginskaya N.V., Mordvinov V.A. *Opisthorchis felinus* infection provokes time-dependent accumulation of oxidative hepatobiliary lesions in the injured hamster liver // PLoS One. – 2019. – Vol. 14, № 5 – P. 1–14.

УДК 612.014.482+575

**Оценка связи полиморфизмов генов WNT-сигналинга
с частотой цитогенетических нарушений при действии ионизирующего излучения**

Д.С. Исубакова

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

Северский биофизический научный центр Федерального медико-биологического агентства
Россия, г. Северск, пер. Чекист, 7, корп. 2, 636013

E-mail: isubakova.daria@yandex.ru

**Assessment of relationship WNT-signaling genes polymorphisms
with frequency of cytogenetic disorders under the action of ionizing radiation**

D.S. Isubakova

Scientific Supervisor: Dr., N.V. Litviakov

Seversk Biophysical Research Center of the Federal Medical-Biological Agency, Russia, Seversk,
Chekist lane, 7, building 2, 636013

E-mail: isubakova.daria@yandex.ru

Abstract. *Presents the results of a study of the association of single nucleotide polymorphisms of the WNT-signaling genes with an increased frequency of cytogenetic disorders in the blood lymphocytes of workers at an ionizing radiation facility exposed to long-term radiation exposure at doses of 100–500 mSv. DNA was genotyped of 2,686 single nucleotide polymorphisms of the WNT-signaling genes using high-density CytoScan™ HD Array (Affymetrix, USA) chips (DNA chips) and real-time polymerase chain reaction. Association of single nucleotide polymorphisms (rs3857434, rs17418801, rs28605102) of the WNT-signaling genes with a high frequency of ring chromosomes, dicentric chromosomes and paired fragments in blood lymphocytes was established, all other types of cytogenetic disorders did not show statistical significance.*

Key words: *ionizing radiation, chromosomal aberrations, single nucleotide polymorphism.*

Введение

WNT-белки представляют собой семейство секретируемых сигнальных полипептидов, которые регулируют большое количество биологических процессов в клетке [1]. WNT-белки участвуют в трансдукции сигнала с плазмолеммы на метаболемы клетки, в частности, WNT-белки соединяются с мембранными рецепторами и запускают внутриклеточные WNT-сигнальные пути [2]: канонический (зависимый от β -катенина) и неканонический (независимый от β -катенина). Канонический сигнальный путь связывают с ответом клетки на радиационно-индуцированные повреждения [3, 4]. Механизмы, лежащие в основе радиационно-индуцированного Wnt/ β -катенин-зависимого ответа клетки, до сих пор остаются мало изученными [4, 5].

Ионизирующее излучение (ИИ) приводит к возникновению нестабильности генома, может изменять клеточные и тканевые реакции, что в свою очередь способствует возникновению заболеваний и патологических состояний [6]. Возникающие реакции организма человека зависят как от параметров облучения ИИ, так и от индивидуальных особенностей клеток. В условиях пролонгированного радиационного воздействия длительное развитие эффектов повреждения клеток и тканей протекает параллельно с компенсаторно-восстановительными процессами, и в значительной степени может быть скорректировано различными факторами (антиоксидантами, системой репарации ДНК, программируемой клеточной гибелью и др.) [7]. Несмотря на многочисленность факторов, анализ генетических эффектов действия ИИ остается одним из наиболее перспективных направлений исследования механизмов повышенного уровня индивидуальной радиочувствительности (ИРЧ) организма человека с целью здоровьесбережения.

ИРЧ – это полигенный признак, который зависит от взаимодействия многих генов и их продуктов, участвующих в регуляции разнообразных клеточных процессов [8]. Как и любой другой признак организма, ИРЧ детерминирована генетически, и характер ответных реакций (в том числе определяемых однонуклеотидной вариабельностью генома) на радиационное воздействие, а также степень выраженности ответных реакций будут характеризовать уровень ИРЧ организма [9]. Поскольку повреждение клетки ИИ не ограничивается прямым повреждением молекулы ДНК [10], а в значительной степени, определяется косвенно [9], то список кандидатных генов, ответственных за формирование повышенного уровня ИРЧ будет включать в себя разные системы клеточной защиты [11].

Цель работы – оценить связь однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) генов WNT-сигналинга с частотой хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах крови работников объекта использования ионизирующего излучения (ОИИИ) под действием долговременного техногенного профессионального облучения ИИ в диапазоне доз 100–500 мЗв.

Экспериментальная часть

На первом этапе с помощью ДНК-чипов высокой плотности CytoScan™ HD Array (Affymetrix, США) проводили оценку связи 2 402 ОНП генов WNT-сигналинга с повышенной частотой ХА для 95 условно здоровых работников ОИИИ, подвергавшихся долговременному радиационному воздействию в процессе профессиональной деятельности в дозах 100–500 мЗв (тестовая группа исследования). На втором этапе проводили валидацию отобранных ОНП с помощью ПЦР в режиме реального времени для 224 условно здоровых работников ОИИИ (валидационная группа исследования), подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности долговременному техногенному внешнему облучению γ -излучением в дозах 100–500 мЗв, и 77 условно здоровых работников ОИИИ (валидационная группа контроля), не подвергавшихся облучению ИИ. Для всех обследованных работников проводили стандартный цитогенетический анализ лимфоцитов крови. Анализировали ХА, распознаваемые без кариотипирования: количество aberrантных клеток, дицентрических и кольцевых хромосом, хромосомных и хроматидных фрагментов, хроматидных обменов (фигуры типа «крест»), полиплоидных клеток, аномальные моноцентрические хромосомы, мультиaberrантные клетки. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft, США). Анализ данных генотипирования проводили по рецессивной модели, которая выбрана согласно критерию Акаике. При анализе данных генотипирования исключены ОНП любого генотипа при $n < 5$. Соответствие распределения генотипов в выборке равновесию Харди – Вайнберга оценивали с помощью программы Court lab HW calculator в формате Excel.

Результаты

С помощью технологии микроматричного исследования для идентификации ОНП, которые были бы ассоциированы с повышенной частотой ХА, индуцируемых при контакте с ИИ, изучены 2 686 ОНП 120 генов WNT-сигналинга. В состав ДНК-чипа входит 750 000 маркеров, позволяющих определить структурные вариации более чем 12 000 генов. В ходе работ из 2 686 ОНП в окончательный статистический анализ отобраны 879 ОНП. Затем проведена оценка ассоциации частоты радиационно-индуцированных ХА в зависимости от 880 ОНП изученных генов у работников тестовой группы исследования. В результате ассоциация с повышенной частотой маркеров радиационного воздействия (дицентрических и кольцевых хромосом) установлена для 34 ОНП.

На втором этапе проведена валидация выявленных 34 ОНП. Проведено сравнение полученных результатов генотипирования с частотой и спектром всех типов, проанализированных ХА в лимфоцитах крови при носительстве разных генотипов по рецессивной модели наследования. Валидационная группа контроля ($n = 77$) во всех

случаях не показала ассоциаций с повышенной частотой ХА. В результате анализа частоты и спектра ХА в зависимости от ОНП исследованных генов в валидационной группе исследования ($n = 224$, диапазон доз 100–500 мЗв) идентифицированы 3 ОНП генов WNT-сигналинга (*rs3857434*, *rs17418801* и *rs28605102*). Валидирована связь ОНП гена *MCC rs3857434*, рецессивный генотип которого ассоциирован с повышенной частотой дицентрических хромосом. Валидирована связь ОНП гена *MAPK10 rs17418801*, рецессивный генотип которого ассоциирован с повышенной частотой дицентрических и кольцевых хромосом. Валидирована связь ОНП гена *WNT7B rs28605102*, рецессивный генотип которого ассоциирован с повышенной частотой хромосомных фрагментов.

Заключение

В результате проведенного исследования выявлены ОНП генов WNT-сигналинга, которые могут рассматриваться в качестве потенциальных маркеров повышенного уровня ИРЧ. Наличие или отсутствие в геноме обследуемого выявленных маркеров позволит судить об ИРЧ и его предрасположенности к развитию радиационно-индуцированных заболеваний. Оценка ИРЧ может являться эффективным инструментом формирования групп риска среди лиц, контактирующих в процессе профессиональной деятельности с источниками техногенного ИИ, для эффективного мониторинга состояния их здоровья и профилактики важнейших социально значимых неинфекционных заболеваний с целью снижения экономических и социально-трудовых потерь, связанных с заболеваемостью и преждевременной смертностью работников ОИИИ.

Список литературы

1. Rim E.Y., Clevers H., Nusse R. The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators // *Annual Review of Biochemistry*. – 2022. – Vol. 91, № 1. – P. 571–598.
2. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signaling // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2012. – Vol. 13, № 12. – P. 767–779.
3. Lacombe J., Zenhausern F. Effect of mechanical forces on cellular response to radiation // *Radiotherapy and Oncology*. – 2022. – № 176. – P. 187–198.
4. Dong Z, Zhou L, Han N, et al. WNT/ β -catenin pathway involvement in ionizing radiation-induced invasion of U87 glioblastoma cells // *Strahlenther Onkologie*. – 2015. – Vol. 191, № 8. – P. 672–680.
5. Watson R.L., Spalding A.C., Zielske S.P. et al. GSK3 β and β -catenin modulate radiation cytotoxicity in pancreatic cancer // *Neoplasia*. – 2010. – Vol. 12, № 5. – P. 357–365.
6. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. – Москва : Медицина, 1989. – 272 с.
7. Аклеев А.В. Реакции тканей на хроническое воздействие ионизирующего излучения // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2009. – Т. 49, № 1. – С. 5–20.
8. Andreassen C.N., Alsner J., Overgaard J. Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis – where and how to look for it? // *Radiotherapy and Oncology*. – 2002. – Vol. 64, № 2. – P. 131–140.
9. Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А. Радиобиология человека и животных. Учебное пособие. – Москва : Высшая школа, 2004. – 549 с.
10. Котеров А.Н., Вайсон А.А. Биологические и медицинские эффекты излучения с низкой ЛПЭ для различных диапазонов доз // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. – 2015. – Т. 60, № 3. – С. 5–31.
11. Литвяков Н.В., Карпов А.Б., Тахауов Р.М. и др. Генетические маркеры индивидуальной радиочувствительности человека. – Томск : Изд-во Том. ун-та, 2011. – 186 с.

УДК 576.53

**Влияние химиотерапии на распределение субпопуляций
опухолевых клеток при раке яичников**

А.Д. Казакова, И.В. Ларионова, А.М. Яцковский

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

Национальный исследовательский Томский государственный университет

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

E-mail: a.kazakova99@mail.ru

Effect of chemotherapy on the distribution of tumor cell subpopulations in ovarian cancer

A.D. Kazakova, I.V. Larionova, A.M. Yatskovskii

Scientific Supervisor: Prof., Dr., N.V. Cherdyntceva

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

E-mail: a.kazakova99@mail.ru

Abstract. Ovarian cancer is a common cancer characterized by a clear prognosis and high mortality compared with other gynecological malignancies such as cervical and endometrial cancer. One of the reasons for the rapid spread of the tumor is the accumulation of ascitic fluid, which contributes to peritoneal dissemination of the tumor. Lymphocytes, macrophages, mesothelial cells, as well as tumor cells that separated from the primary tumor and escaped anoikis were found in the ascitic fluid. Increased expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), cytokeratins (CK), and tumor-associated calcium transducer 2 (TROP2) in ovarian cancer tissue is often associated with worse prognosis. However, there are practically no studies regarding the expression of these proteins by tumor cells located in ascitic fluid.

Key words: ovarian cancer, tumor cells, ascites, tumor tissue, spheroids.

Введение

Рак яичников – широко распространенное онкологическое заболевание, характеризующееся худшим прогнозом и высокой смертностью по сравнению с другими гинекологическими злокачественными новообразованиями, такими как рак шейки матки и эндометрия [1]. Основным подходом к лечению рака яичников является неоадьювантная химиотерапия (НАХТ) на основе платины (карбоплатин и паклитаксел) с последующей операцией. Несмотря на хороший первичный ответ, у 70 % пациентов в течение короткого периода времени возникает рецидив, опухоль метастазирует, и развивается множественная лекарственная устойчивость [1]. Одной из причин быстрого распространения опухоли является накопление асцитической жидкости, которая способствует перитонеальной диссеминации опухоли. В составе асцитической жидкости обнаружены лимфоциты, макрофаги, мезотелиальные клетки, а также опухолевые клетки, отделившиеся от первичной опухоли и избежавшие аноикиса. Опухолевые клетки в асцитической жидкости могут находиться как в дискретном (единичном) состоянии, так и формировать сфероиды [1].

Основными прогностическими маркерами, согласно литературным данным, являются такие белки как, молекула адгезии эпителиальных клеток (EpCAM), рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2), цитокератины (СК), и опухоле-ассоциированный кальциевый передатчик сигнала 2 (TROP2) [2, 3]. Повышенная экспрессия этих белков в ткани рака яичников зачастую связана с худшим прогнозом [2, 3]. При этом исследований касательно экспрессии этих белков опухолевыми клетками, находящимися в асцитической жидкости, практически нет.

В данном исследовании мы впервые проанализировали различные субпопуляции опухолевых клеток в ткани яичников и сальнике, и в асцитической жидкости, полученных от

пациентов с диагнозом рак яичников. Кроме того, мы изучили влияние НАХТ на изменение субпопуляционного состава опухолевых клеток в асцитической жидкости.

Материалы и методы исследования

В исследование было включено 45 больных с верифицированным диагнозом рак яичников, среди которых 12 пациентов получали НАХТ. В ходе работы было проанализировано четыре типа образцов: первичная опухоль, ткани с канцероматозом (сальник), единичные опухолевые клетки и опухолевые сфероиды в составе асцитической жидкости. Во время операции были получены образцы асцитической жидкости. Асцитическая жидкость центрифугировалась и полученный клеточный осадок ресуспендировался и использовался для приготовления цитоспинов. Для гистологического исследования белковой экспрессии были использованы FFPE-образцы опухолевой ткани и сальника. Производился анализ экспрессии эпителиальных маркеров (EpCAM, HER2, TROP2 и цитокератина (СК)) для каждого образца. Проводилось иммунофлуоресцентное окрашивание по следующей схеме: СК/TROP2 и EpCAM/HER2. Визуализация осуществлялась при помощи конфокального микроскопа. Затем производился подсчет клеток различного фенотипа в окрашенных образцах. Статистическая обработка результатов проводилась в программе Statistica 10.

Результаты

При сравнении всех типов образцов было показано, что в асцитической жидкости повышается экспрессия TROP2 в составе сфероидов (0,5 (0,0–29,25) $p = 0,0023$), в единичных клетках (5,5 (0,0–25,5) $p = 0,0001$) в сравнении с экспрессией в ткани первичной опухоли (0,0 (0,0–0,0) и в сальнике (0,0 (0,0–0,0) ($p = 0,0036$; $p = 0,0001$), соответственно. Экспрессия СК напротив была выше в ткани первичной опухоли (81,50 (63,5–95,75)) и сальнике (89,50 (62,0–97,2)), по сравнению с экспрессией в образцах асцитической жидкости: в сфероидах (4,5 (0,0–37,0) ($p = 0,0001$; $p = 0,0001$) и в единичных клетках (1,0 (0,0–10,0) ($p = 0,0004$; $p = 0,0001$), соответственно. Для EpCAM и HER2 различия в экспрессии выявлено не было (рис. 1).

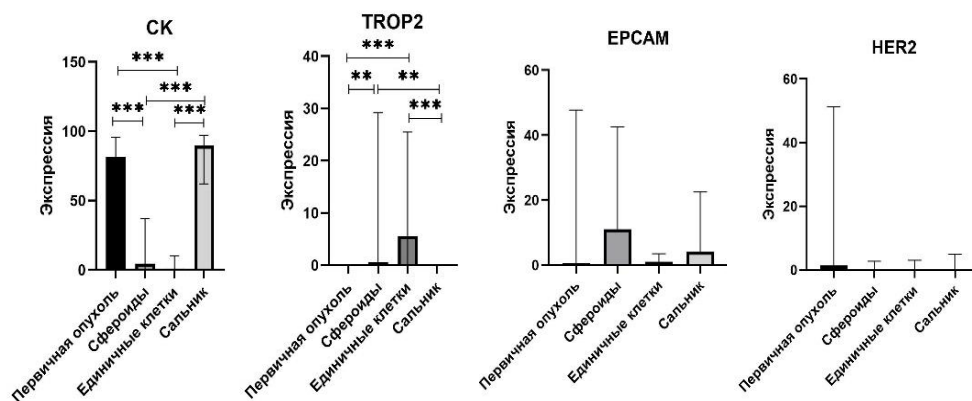


Рис. 1. Экспрессия цитокератина (СК), TROP2, EpCAM, и HER2 в асцитической жидкости и опухолях больных раком яичников

После НАХТ отмечалось повышение количества единичных опухолевых клеток в асцитической жидкости, экспрессирующих одновременно EpCAM и HER2 на уровне тенденции к статистической значимости ($p = 0,06$): 12,5 (1,5–30) после НАХТ и 2,0 (0,0–13,0) без НАХТ, соответственно (рис. 2). В случае с экспрессией в опухолевых сфероидах в асцитической жидкости, статистически значимых различий отмечено не было.

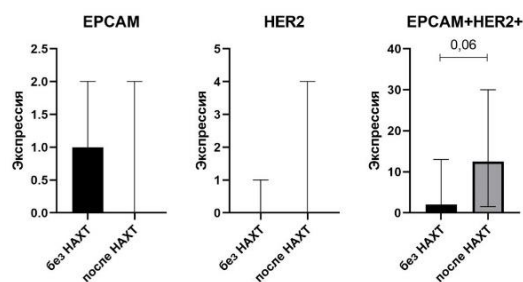


Рис. 2. Экспрессия EpCAM и HER2 в единичных клетках асцитической жидкости при раке яичников
Примечания: НАХТ – неоадьювантная химиотерапия

В ткани первичной опухоли после НАХТ напротив отмечалось снижение количества клеток, экспрессирующих одновременно EpCAM и HER2 ($p = 0,0047$): 0,0 (0,0–0,0) после НАХТ и 6,0 (0,0–32,25) без НАХТ, соответственно. В сальнике после НАХТ также отмечалось снижение количества клеток, экспрессирующих EpCAM по сравнению со значениями без НАХТ (4,5 (0,0–12,75) против 0,0 (0,0–0,0) $p = 0,009$). Количество клеток, экспрессирующих HER2 тоже снижалось, но на уровне тенденции к статистической значимости (0,0 (0,0–5,0) против 0,0 (0,0–0,0) $p = 0,08$). При этом статистически значимые различия были получены для двойных позитивных клеток по EpCAM и HER2: 20,0 (0,75–43,25) без НАХТ, по сравнению с 0,0 (0,0–0,0) после НАХТ ($p = 0,009$), соответственно (рис. 3).

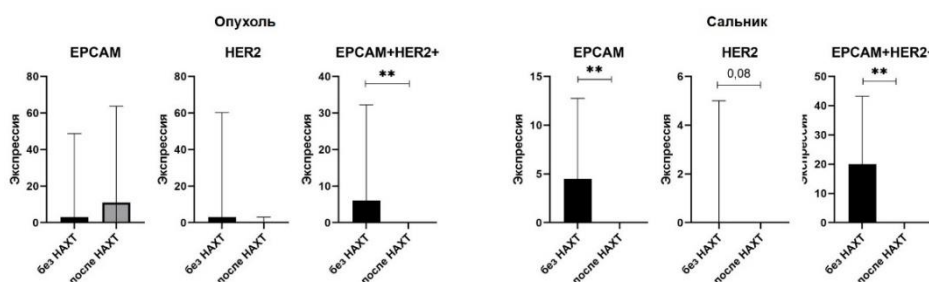


Рис. 3. Экспрессия EpCAM и HER2 в опухоли и сальнике при раке яичников
Примечания: НАХТ – неоадьювантная химиотерапия

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о влиянии химиотерапии на изменение субпопуляционного состава опухолевых клеток в ткани и асцитической жидкости.

Работа выполнена при поддержке проекта РНФ №21-75-10021 «Изучение функционального программирования опухолеассоциированных макрофагов в прогрессии рака яичников и ответа опухоли на химиотерапию с целью рационализации противоопухолевого лечения».

Список литературы

1. Rakina M., Kazakova A., Villert A., Kolomiets L., Larionova I. Spheroid Formation and Peritoneal Metastasis in Ovarian Cancer: The Role of Stromal and Immune Components // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23, № 11. – P. 6215. doi: 10.3390/ijms23116215.
2. Xu T., Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Vorontsova O. et al. Imaging-Guided Therapy Simultaneously Targeting HER2 and EpCAM with Trastuzumab and EpCAM-Directed Toxin Provides Additive Effect in Ovarian Cancer Model // Cancers (Basel). – 2021. – Vol. 13, № 16. – P. 3939. doi: 10.3390/cancers13163939.
3. Taube E.T., Denkert C., Sehouli J., Unger U., Kunze C.A. et al. Cytokeratin 5/6 expression, prognosis, and association with estrogen receptor α in high-grade serous ovarian carcinoma // Hum Pathol. – 2017. – Vol. 67. – P. 30–36. doi: 10.1016/j.humpath.2017.03.020.

УДК 616-005.8

Влияние эндогенных опиоидных пептидов на постишемическую сократительную функцию левого желудочка крыс при адаптации к непрерывной хронической нормобарической гипоксииА.С. Кан, И.А. Деркачев

Научный руководитель: Б.К. Курбатов

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

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

E-mail: kan989817@gmail.com**Effect of endogenous opioid peptides on post-ischemic contractile function of the left ventricle of rats during adaptation to continuous chronic normobaric hypoxia**A.S. Kan, I.A. Derkachev

Scientific Supervisor: B.K. Kurbatov

Tomsk national research medical center of the Russian Academy of Sciences,
Cardiology research institute, Russia, Tomsk, Kievskaya Str., 111 a, 634012E-mail: kan989817@gmail.com

Abstract. In recent years, in modern clinical practice there has been no reduction in in-hospital mortality from acute myocardial infarction (AMI), which demonstrates the need to develop new approaches to treatment. One of the promising ways is to study the mechanisms of the cardioprotective effect of chronic normobaric hypoxia. It has been shown that the infarct-limiting effect of continuous normobaric hypoxia is associated with an increase in the level of endogenous opioid peptides. Considering the fact that the main cause of mortality in patients with AMI is acute impairment of cardiac contractile function, there is a need to study the role of endogenous opioid peptides in improving contractile function. During the study, new pharmacological targets for correcting myocardial contractility disturbances during ischemia and reperfusion may be proposed. The study was conducted on Wistar rats. The rats underwent coronary artery occlusion (45 min) and reperfusion (120 min). Transthoracic echocardiography was performed to assess the contractile function of the left ventricle. Ultrasound studies were conducted at the following time points: (1) before ischemia; (2) 20 minutes of reperfusion; (3) 90 minutes of reperfusion. The content of opioid peptides in myocardial tissue was studied using ELISA kits. In the course of the study, it was found that adaptation to CNNG affects post-ischemic contractility of the heart. Improvement in contractility is associated with changes in the content of endogenous opioid peptides in the myocardium of animals.

Key words: heart, ischemia-reperfusion, continuous chronic normobaric hypoxia, opioid peptides

Введение

За последние годы в современной клинической практике наблюдается отсутствие снижения внутрибольничной смертности от острого инфаркта миокарда (ОИМ) [1], что демонстрирует необходимость разработки новых подходов в лечении. Одним из перспективных подходов является изучения механизмов кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии. Так было показано, что инфаркт-лимитирующее влияние непрерывной нормобарической гипоксии связано с увеличением уровня эндогенных опиоидных пептидов и зависит от активации μ - и σ_2 - опиоидных рецепторов [2]. Учитывая тот факт, что основная причина смертности у пациентов с ОИМ является острое нарушение сократительной функции сердца [3], видится необходимость в изучении именно роли эндогенных опиоидных пептидов в улучшение сократительной функции. В ходе работы могут быть предложены новые фармакологические мишени для коррекции нарушения сократимости сердца при ишемии и реперфузии.

Цель исследования определить роль эндогенных опиоидных пептидов на постишемическую сократительную функцию левого желудочка крыс при адаптации к непрерывной хронической нормобарической гипоксии.

Материалы и методы исследования

Работа была выполнена на крысах Вистар. Животных содержали в стандартных условиях вивария НИИ кардиологии. Содержание животных и уход за ними производился на основании законодательных и нормативных документов, регламентирующих работу с лабораторными животными.

Для моделирования адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ) крыс содержали в течение 21 дня в герметичной камере с уровнем кислорода 12 %. Модель ишемии/реперфузии выполняли следующим образом: животных наркотизировали α -хлоралозой (100 мг/кг внутривенно), накладывали лигатуру на верхнюю треть левой коронарной артерии. Реперфузию осуществляли путем снятия лигатуры с левой коронарной артерии с визуальным контролем возобновления коронарного кровообращения по гиперемии ишемизированной области.

Для оценки сократительной функции левого желудочка проводили трансторакальную эхокардиографию на ультразвуковой диагностической системе для экспериментальных животных Vevo3100 (VisualSonics, Торонто, Канада) с помощью датчика с базовой частотой 30 МГц. Ультразвуковые исследования были проведены на следующих временных точках: (1) до ишемии; (2) 20 минута реперфузии; (3) 90 минута реперфузии. При постобработке изображений были получены следующие параметры: ударный объем (УО, мл); конечный систолический объем ЛЖ (КСО, мл); конечный диастолический объем ЛЖ (КДО, мл); фракция выброса (ФВ, %); сердечный выброс (СВ, мл).

Исследование содержания опиоидных пептидов в ткани миокарда проводили ELISA наборами CEA806Ra бета-эндорфин (Cloud-Clone, Китай); E02M0367 мет-энкефалин (BlueGene, Китай); E02L0284 лей-энкефалин (BlueGene, Китай); E02E0522 эндоморфин-1 (BlueGene, Китай); E02E0143 эндоморфин-2 (BlueGene, Китай); CEB187Ra динорфин (Cloud-Clone, Китай), E02D0535 динорфин А (BlueGene, Китай).

Результаты

Исходные значения параметров сократимости в исследуемых группах не отличались. Коронароокклюзия и последующая реперфузия в контрольной группе крыс приводили к двукратному увеличению конечного систолического объема (КСО, с 63 ± 1 до $142,71 \pm 1$ мкл), снижению фракции выброса (ФВ, с 72 ± 1 до 38 ± 2 %); в полтора раза снизился ударный объем (УО, с $167 \pm 6,75$ до $91 \pm 6,39$ мкл) и сердечный выброс (СВ, с $51,54 \pm 2,10$ мкл до $29,33 \pm 2,04$ мкл) к 20 минуте реперфузии.

Через 90 минут после начала реперфузии сократительная функция миокарда у крыс контрольной группы частично восстановилась. КСО составил 125 ± 1 мкл, ФВ выросла до 47 ± 1 %, УО до 112 ± 7 мкл, СВ до 38 ± 2 мкл. Важно отметить, что сократительная функция миокарда была значительно ниже исходных значений.

У крыс, адаптированных к ХНГ, на 20-й минуте реперфузии параметры сократительной функции миокарда значимо не отличались от таковых в контрольной группе. Однако исследования этих параметров спустя 90 минут реперфузии показали их значительное улучшение. Так, КСО снизился с 125 ± 1 мкл у контрольных крыс до 100 ± 2 мкл в группе ХНГ ($p < 0.0001$); ФВ возросла с 47 ± 2 % до 57 ± 1 % ($p = 0,00087$); УО с 112 ± 7 мкл до 131 ± 4 мкл ($p = 0,03$); СВ с 38 ± 2 мкл до 44 ± 2 мкл ($p = 0.045$).

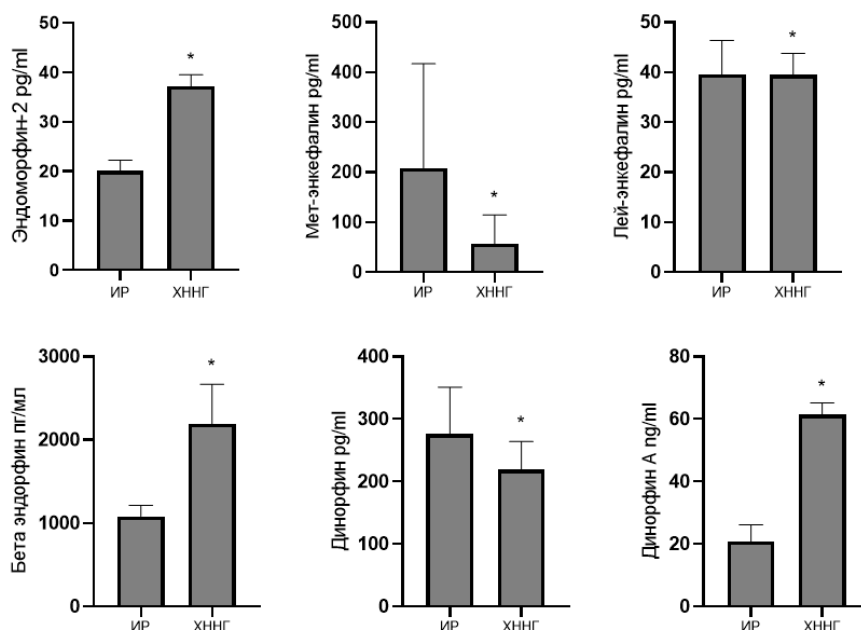


Рис. 1. Содержание опиоидных пептидов в миокарде при адаптации к хронической непрерывной гипоксии.

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

ИР – ишемия/реперфузия, ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия

При изучении корреляционных взаимосвязей содержания опиоидных пептидов в ткани миокарда с параметрами его сократимости были обнаружены обратные зависимости между уровнями эндоморфина-2 ($r = -0,68$, $p < 0,05$), динарфина А ($r = -0,53$, $p < 0,05$), бета эндорфина ($r = -0,71$, $p < 0,05$), мет-энкефалина ($r = -0,65$, $p < 0,05$), лей-энкефалина ($r = -0,38$, $p < 0,05$) и КСО на 90 минуте реперфузии. Обнаружены прямые взаимосвязи между содержанием в миокарде эндоморфина-2 ($r = 0,56$, $p < 0,05$), динарфина А ($r = 0,37$, $p < 0,05$), бета эндорфина ($r = 0,70$, $p < 0,05$), мет-энкефалина ($r = 0,50$, $p < 0,05$) и ФВ на 90 минуте реперфузии. Обнаружено, что УО и СВ миокарда имеют прямые корреляционные взаимосвязи с содержанием в миокарде эндоморфина-2 ($r = 0,41$ и $0,42$ соответственно, $p < 0,05$), бета-эндорфина ($r = 0,62$ для обоих параметров, $p < 0,05$), мет-энкефалина ($r = 0,39$ и $0,41$, $p < 0,05$).

Заключение

В результате проведенного исследования было выявлено, что адаптация к ХННГ оказывает значительный эффект на постисхемическую сократимость сердца. Улучшение сократимости связано с увеличением содержания эндогенных опиоидных пептидов в миокарде животных.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00048).

Список литературы

1. Salari N. et al. The global prevalence of myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis // BMC cardiovascular disorders. – 2023. – Vol. 23., №. 1. – P. 206.
2. Prokudina E. S. et al. Effect of Chronic Continuous Normobaric Hypoxia on Functional State of Cardiac Mitochondria and Tolerance of Isolated Rat Heart to Ischemia and Reperfusion: Role of μ and delta2 Opioid Receptors // Physiological research. – 2019. – Vol. 68., №. 6. – P. 909–920.
3. Nägele M. P., & Flammer A. J. Heart Failure After Right Ventricular Myocardial Infarction // Current heart failure reports. – 2022. – Vol. 19., №. 6. – P. 375–385.

УДК 616.995.122

**Активация ангиогенеза в печени на модели хронического описторхоза
и на клиническом материале**

Я.К. Капушчак, А.В. Ковнер

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

Институт Цитологии и Генетики СО РАН

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

E-mail: YarikKaps@yandex.ru

**Activation of angiogenesis in the liver on a model of chronic opisthorchiasis
and on clinical material**

Y.K. Kapushchak, A.V. Kovner

Scientific Supervisor: Dr., M. Yu. Pakharukova

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

E-mail: YarikKaps@yandex.ru

Abstract. *Opisthorchis felinus* is a liver fluke that infects humans and other mammals, causing chronic inflammation and fibrosis of the bile ducts. In present study, we investigated the relationship between *O. felinus* infection and de novo vessel synthesis in the liver. We found that *O. felinus* infection led to upregulation of young CD34+ vessels and old CD31+ vessels, which strongly correlated with the development of liver fibrosis. These findings suggest that *O. felinus* infection promotes angiogenesis and contributes to the progression of liver fibrosis. Our results have important implications for understanding the pathogenesis of *O. felinus* infection and for developing new therapies to treat this disease.

Key words: *Opisthorchis felinus*, liver fibrosis, neoangiogenesis.

Введение

Описторхоз – это широко распространенное заболевание, которое характеризуется паразитированием печеночного сосальщика в гепатобилиарной системе рыбоядных млекопитающих, включая человека. Заражение происходит при употреблении в пищу рыбы семейства карповых, которая не прошла достаточной термической обработки. Описторхоз, вызываемый *Opisthorchis felinus* (OF) распространен, преимущественно, на территории западной Сибири, особенно в бассейне рек Обь и Иртыш [1, 2]. Заражение описторхозом приводит к ряду патологических изменений в ткани печени, в первую очередь, к пролиферации эпителия желчных протоков, с последующим развитием его гиперплазии и дисплазии, а также к развитию фиброза печени, преимущественно вокруг желчных протоков (перидуктальный фиброз). [3]. Ранее было продемонстрировано, что развитие фиброза сопровождается пролиферацией сосудов печени, в том числе в динамике других паразитических инфекций, включая описторхоз, вызываемый *O. viverrini*. Активация ангиогенеза может выступать, одним из ключевых механизмов, способствующих развитию фиброза, а исследование этого процесса может помочь в создании комплексной терапии описторхоза. Цель данного исследования, заключалась в оценке изменения уровня новообразованных сосудов в ткани печени экспериментальных животных *Mesocricetus auratus*, зараженных *Opisthorchis felinus* в динамике хронической инфекции длительность до 18 месяцев, и у людей, зараженных OF в естественных условиях и обнаружение взаимосвязи между уровнем фиброза и пролиферацией сосудов.

Экспериментальная часть

Метацеркарии *Opisthorchis felinus* были получены из мышечной ткани рыб семейства карповых, выловленных из реки Обь. Золотистые хомячки *Mesocricetus auratus* заражали перорально 75-метацеркариями *O. felinus*, через эзофагогастральный зонд. Забор материала

осуществлялся через 1, 3, 6, 9, 12 и 18 месяцев после заражения (на каждом сроке было по 5 животных). Для каждой экспериментальной группы *M. auratus* была контрольная группа неинфицированных животных по 3 и более животных в каждой. Поскольку отличий между контрольными животными разных сроков обнаружено не было, они были объединены в одну группу. Образцы печени человека были получены при выполнении холецистэктомии. В исследовании принимали участие 12 мужчин (средний возраст 59 лет), зараженных *O. felineus* и 8 мужчин (средний возраст 63 года), не зараженных паразитом. Все пациенты предоставили свое добровольное согласие. Оценка патоморфологических изменений печени осуществлялась с помощью количественного морфометрического анализа. Морфометрическая оценка подразделяется на несколько этапов. На первом этапе мы получаем поля зрения (фотографии) срезов органов в разрешении 4248x2832 пикселя. Плотность пикселей на дюйм составляет 96 точек. На втором этапе осуществляется анализ срезов органа в программе «Мофрометрия». Для оценки уровня перидуктального фиброза на поле зрения накладывается сетка 10x10 квадратов. Затем осуществляется подсчет квадратов, в которых наблюдается один из выбранных патологических признаков. Полученное число делится на общее количество квадратов сетки, то есть на 100 (10x10) и умножается на 100 процентов. Подсчет осуществляли на 50 полях зрения. Для получения выраженности перидуктального фиброза в органе, данные усредняли на количество полей. Для определения уровня амилоидоза сосудов печени гистологические срезы были окрашены с использованием Конго-Ред. Для оценки уровня новообразованных и «старых» сосудов проводился иммуногистохимический (ИГХ) анализ срезов против маркеров CD34 и CD31 соответственно. Статистический анализ данных был проведен в R.

Результаты

На первом этапе исследования мы оценили количество новообразованных CD34+ сосудов и уровень маркера общего количества сосудов CD 31+, в динамике хронической *O. felineus* – инфекции. Оценка осуществлялась с помощью морфометрического анализа гистологических срезов после иммуногистохимического окрашивания. Общее количество сосудов, включающее как новообразованные, так и «старые» сосуды (CD31+) достоверно отличалось от контроля с 6-го месяца инфекции. Количество сосудов увеличивалось в динамике описторхоза и достигало максимума к 18-му месяцу превышая контрольное значение в 2,1 раза. При этом стоит отметить, что общее количество сосудов колебалось незначительно после 6-го месяца и, в среднем, находилось в диапазоне между 19 и 21 сосудом на поле зрения. Тем не менее, несмотря на плато, на всем протяжении исследуемого периода хронической инфекции (18 месяцев) мы имеем тренд на увеличение количества сосудов в ткани печени. При окрашивании Конго-Ред, нами было обнаружено отложение амилоида в стенках крупных сосудов, преимущественно артериол. Количество амилоида увеличивалось в динамике инфекции и уже с шестого месяца достоверно превышало контрольное значение. В то время как, в контрольных образцах наблюдалось 0 амилоид-положительных сосудов на поле зрения, на 6-ом месяце их количество составило, в среднем, 0.73. На 18-ом месяце, сосуды с амилоидом, в среднем, находилось на уровне 0.95, что также указывает на замедление скорости накопления амилоида. Отложение амилоида также было отмечено в области перидуктального фиброза и воспалительных инфильтратов. В динамике инфекции, вызываемой *O. felineus*, было отмечено резкое увеличение количества новообразованных CD34+ сосудов. Превышение контрольных значений наблюдается уже с первого месяца инфекции. Уровень новообразованных сосудов оставался повышенным в течении всего эксперимента, однако максимальных значений этот параметр достигал в хронологической середине эксперимента, то есть к 9-му месяцу исследования. На этом сроке количество новообразованных сосудов составляло, в среднем 25,2 на поле зрения. С первого по девятый месяц выделяется положительный линейный тренд на увеличение новообразованных сосудов ($t = 4,09$, $P < 0,001$), однако, после порождения пика мы отмечали постепенное снижение количества CD 34+ сосудов к 18-му месяцу ($t = -2,701$, $P < 0,017$). Таким образом, можно

выделить два тренда в изменении количества новообразованных сосудов: нарастание с 1-го по 9-ый месяц с последующим снижением с 9-го до 18-го месяца инфекции. Тем не менее, количество новообразованных сосудов, в рамках данного эксперимента, так и не опускается до контрольных значений. Уровень фиброза превышал контрольные значения с первого месяца инфекции, однако, важно отметить, что с 1-го по 6-ой месяц фиброз увеличивался практически в 4-ре раза (10 % площади среза на 1-ом месяце против 46 % - на 6-ом), однако после этого он значительно не меняется, оставаясь в диапазоне от 40 % до 50 %. На втором этапе, мы, помощью RT-PCR, дополнительно оценивали уровни экспрессии двух генов, *Cd31* и *Cd34* также в динамике хронической инфекции. Результаты RT-PCR показывают сходную, с иммуногистохимическим анализом, картину. Уровень экспрессии гена *Cd34* резко увеличивается к третьему месяцу заражения *O. felineus*, однако в дальнейшем уровень экспрессии гена колебался в динамике незначительно, оставаясь тем не менее выше контрольных значений. Аналогичным образом изменялась экспрессия гена *Cd31*. Уровень *Cd31* мРНК резко повышался к третьему месяцу описторхоза, после чего оставался на примерно одном уровне, вплоть до 13-го месяца заражения. При исследовании ткани печени людей, зараженных OF, мы не обнаружили заметного увеличения общего количества CD31+ сосудов, однако количество новообразованных CD34+ сосудов превышало таковое у незараженной группы в 4,9 раза. Уровень амилоидоза сосудов печени также превышал значения контрольной группы в 2,6 раза.

Заключение

Нами продемонстрирована динамика изменения уровня фиброза, а также количества новообразованных сосудов, с помощью ИГХ анализа и ПЦР. Активное новообразование сосудов приходится на ранний этап хронического заболевания, то есть до 9-го месяца инфекции. После преодоления этой временной отметки наблюдается снижение активности процесса образования «молодых» сосудов и, на 18-ом месяце, количество CD34+ сосудов снижается к уровню, наблюдаемому на 1-ом месяце. Активное нарастания уровня перидуктального фиброза, приходится на тот же временной отрезок, хотя и достигает максимальных значений несколько раньше, между шестым и девятым месяцем. Преодолев эту временную отметку, образование фиброза значительно замедляется, однако уже имеющаяся соединительная ткань не исчезает и значения выходят на плато. По-видимому, активация синтеза соединительной ткани, сопровождается активацией образования молодой сосудистой сети, однако после стабилизации процесса фиброзирования печени новообразование сосудов постепенно замедляется, что объясняет динамику изменения CD34+ и CD31+ маркеров. Описторхоз также сопровождается развитием амилоидоза сосудов, который преимущественно откладывается в стенках артериол. Данные полученные при исследовании ткани печени людей, зараженных в естественных условиях, хорошо согласуются с данными, полученными на экспериментальной модели. У людей также наблюдается повышенный уровень новообразованных сосудов и амилоидоз печени.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№24-25-00082).

Список литературы

1. Pakharukova M.Y., Mordvinov V.A. The liver fluke *Opisthorchis felineus*: biology, epidemiology and carcinogenic potential // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2016 – Vol. 110, № 1. – P. 28–36.
2. Kapushchak, Y. K., Zaparina, O. G., Mordvinov, V. A., Pakharukova, M. Y. Time-dependent renal pathologies associated with the liver fluke infection, opisthorchiasis felinea // Acta tropica. – 2022 – Vol. 228. – P. 106282
3. Foglia B. Hypoxia, Hypoxia-Inducible Factors and Liver Fibrosis. // Cells. – 2021 – Vol. 10, № 7. – P.1764.

УДК 616-092.9

**Стресс-индуцированное повреждение сердца:
параметры воспаления и сократимости миокарда**
М. Килин, Б.К. Курбатов

Научный руководитель: профессор, д.м.н. Л.Н. Маслов
Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный
исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
Россия, г. Томск, ул. Киевская, 111 а, 634012
E-mail: Kilin112233@gmail.com

Stress-induced cardiac injury: parameters of myocardial inflammation and contractility

M. Kilin, B.K. Kurbatov
Scientific Supervisor: Prof., PhD, L.N. Maslov
Tomsk national research medical center of the Russian Academy of Sciences,
Cardiology research institute, Russia, Tomsk, Kievskaya Str., 111 a, 634012
E-mail: Kilin112233@gmail.com

Abstract. *Prerequisites for conducting the study. Takotsubo syndrome (ST) is characterized by contractile dysfunction of the myocardium and usually affects the apical part of the heart without obstruction of the coronary artery. ST is characterized by an increase in the blood level of markers of myocardial necrosis, prolongation of the QTc interval, microvascular dysfunction, spasm of epicardial coronary arteries, myocardial edema and life-threatening ventricular arrhythmias. Endomyocardial biopsy of patients with ST shows the presence of mononuclear infiltrates and necrosis of cardiomyocytes, and magnetic resonance imaging reveals myocardial edema. An increase in the number of leukocytes was observed in the blood of patients with ST.*

Key words: heart, stress, inflammation, contractility

Введение

Синдром такоцубо (СТ) редкое, но опасное заболевание, характеризующееся сократительной дисфункцией миокарда, и обычно поражает верхушечный отдел сердца без обструкции коронарной артерии [1]. Для СТ характерно увеличение в крови уровня маркеров некроза миокарда, удлинение интервала QTc, микрососудистая дисфункция, спазм эпикардиальных коронарных артерий, отек миокарда и опасные для жизни желудочковые аритмии [2]. Встречаемость синдрома такоцубо в 9 раз выше у женщин, в возрасте 60–70 лет, чем у мужчин. Госпитальная летальность среди больных СТ соответствует 3,5–12 %, что соответствует летальности при остром инфаркте миокарда (ОИМ) с подъёмом сегмента ST (STEMI) [3]. Эндомиокардиальная биопсия пациентов с СТ демонстрирует наличие мононуклеарных инфильтратов и некроз кардиомиоцитов, а магнитно-резонансная томография идентифицирует отек миокарда [4].

Новизна данного исследования заключается в определении параметров крови и сократимости миокарда при воспалении при использовании модели стресс-индуцированного повреждения сердца

Цель работы, определить основные параметры воспаления при стресс-индуцированном повреждении сердца и параметры сократимости *in vivo*.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на 48 крысах-самках линии Вистар. Моделирование иммобилизационного стресса проводилось путем иммобилизации животных на спине в течение 3, 12, 24 часов с предшествующим лишением доступа к пище за 16 часов до иммобилизации. После окончания иммобилизации, производили взятие крови из сонной

артерии с последующим заборов органов мишеней “Триады Селье”, таких как тимус, селезенка, надпочечники, для оценки выраженности стресс-реакции. СОЭ определяли при помощи метода Панченкова. Лейкоцитарную формулу определяли при помощи с помощью гематологического анализатора Nemaх 330 vet. Оценка сократимости проводилась с помощью УЗИ сканера Vevo 3100. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA 13.0. Результаты всех экспериментов приведены в таблицах и на диаграммах в виде $M \pm SD$ (где M – среднее, SD – стандартное отклонение). Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Иммобилизация животных в течение 12 ч приводила к повышению количества лейкоцитов в крови в 2,2 раза, по отношению к интактным животным. После 24-х часовой иммобилизации, количество лейкоцитов у животных было увеличено в 1,8 раза. При 3-х, 12-ти часовом иммобилизационном стрессе происходило смещение лейкоцитарной формулы влево, а при 24-х часовом стрессе, смещение лейкоцитарной формулы вправо. Смещение влево обусловлено повышением количества гранулоцитов, пиковое значение которых приходится на 12 часов иммобилизации. Одновременно было в 2 раза повышено количество лимфоцитов и моноцитов по отношению к значениям у интактных животных ($p < 0,05$). СОЭ у животных, подверженных иммобилизации в течении суток, не имеет статистически значимых различий (рис. 1)

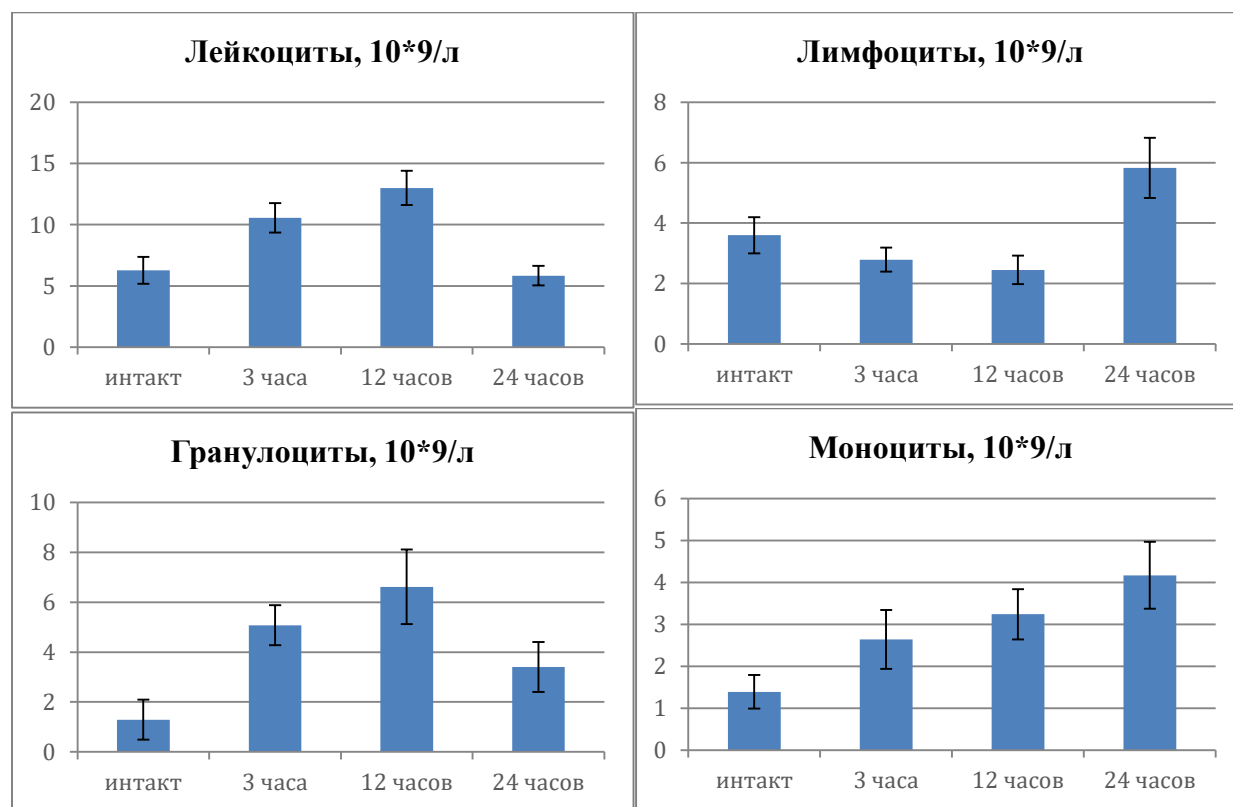


Рис. 1. Параметры крови при воспалении, при стресс-индуцированном повреждении сердца в течении суток ($M \pm SD$)

Конечное систолическое давление (КСО) у животных, подверженных иммобилизации в течении суток, наблюдалось снижение объема (3 часа) с последующим повышением по сравнению с интактными животными (12, 24 часа). Фракция выброса левого желудочка (ЛЖ) у животных, подверженных иммобилизации в течении 3 часов, оставалась без изменений.

Через 12 ч иммобилизации, зафиксировано начало падения фракции выброса ЛЖ. Через 24 ч, фракция выброса ЛЖ уменьшилась на 50% по сравнению с интактной группой ($p < 0,05$). У половины животных визуализируется характерное для СТ баллонирование ЛЖ (рис. 2).

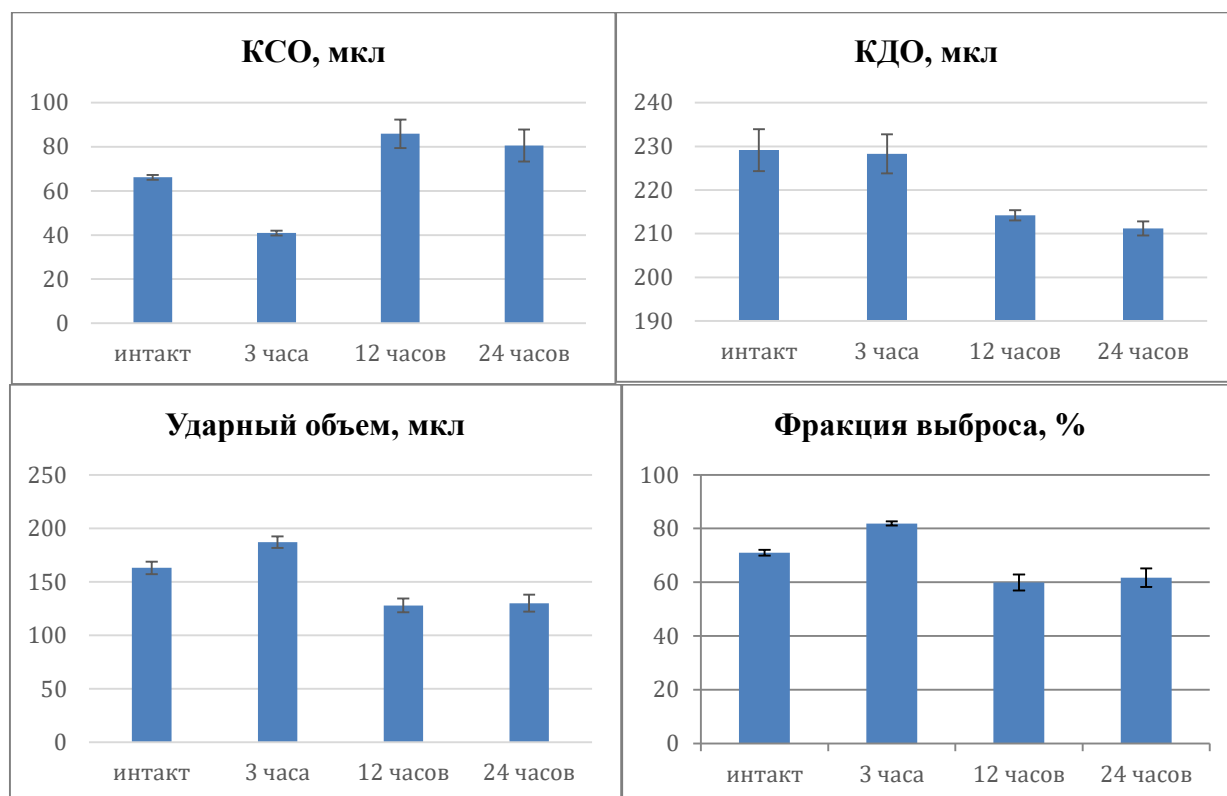


Рис. 2. Параметры сократимости сердца при стресс-индуцированном повреждении сердца в течении суток ($M \pm SD$)

Заключение

Установлено, что иммобилизационный стресс в течении 12 часов вызывает умеренный лейкоцитоз, с повышением количества гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов, уменьшение фракции выброса ЛЖ с баллонированием ЛЖ.

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

Список литературы

1. Kurbatov B.K. et al. The role of adrenergic and muscarinic receptors in stress-induced cardiac injury // Pflügers Archiv-European Journal of Physiology. – 2021. – V. 473. – P. 1641–1655.
2. Suspitsyna I.N., Sukmanova I.A. Takotsubo syndrome. Clinical and pathogenetic aspects. Basics of diagnosis and treatment // Kardiologiya. – 2019. – V. 60, № 2. – P. 96–103.
3. Prokudina E.S., Kurbatov B.K., Maslov L.N. Clinical Manifestation of Stressful Cardiomyopathy (Takotsubo Syndrome) and the Problem of Differential Diagnosis with Acute Myocardial Infarction // Kardiologiya. – 2020. – V. 60, № 11. – P. 777–777.
4. Jensch P.J., Stiermaier T., Eitel I. Takotsubo Syndrome—Is There a Need for CMR? // Current Heart Failure Reports. – 2021. – V. 18. – P. 200–210.

УДК: 616.995.1

**Ранозаживляющий потенциал экскреторно-секреторного продукта
Opisthorchis felinus на модели сахарного диабета 2 типа**

А.В. Ковнер, Я.К. Капушчак, О. Запарина

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

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН

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

E-mail: anya.kovner@gmail.com

**Wound healing potential of the excretory-secretory product
Opisthorchis felinus in a model of type 2 diabetes mellitus**

A.V. Kovner, Y.K. Kapushchak, O. Zaparina

Scientific Supervisor: Dr., M.Yu. Pakharukova

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,

Russia, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva, 10, 630090

E-mail: anya.kovner@gmail.com

Abstract. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) accounts for 80-90% of diabetes cases, with impaired wound healing being a debilitating complication. Non-healing wounds in T2DM patients often lead to increased infection risk, amputation, and reduced quality of life. Current treatments are limited, necessitating the search for new therapeutic approaches to address this growing global health issue. The Opisthorchiidae family, including *Opisthorchis felinus*, has been found to possess the ability to reduce acute inflammation and stimulate the restoration of damaged epithelium and remodeling of the extracellular matrix in the liver. Bioactive molecules from parasitic trematodes could potentially become new perspective wound-healing agents. Aim of the study: To investigate the wound healing properties of the excretory-secretory product (ESP) derived from *Opisthorchis felinus* in a type 2 diabetes mellitus model in vivo. Materials and Methods: 56 db/db male mice (2 months old) were inflicted with 8 mm diameter superficial wounds. Experimental groups included non-specific controls (vehicle, methylcellulose 1.5 %), a specific control (PDGF 0.01 %), and specific treatment groups (ESP 10 mcg without endotoxin). Histological and molecular biology methods assessed wound healing rate, inflammation, epidermal thickness, vessels number, and expression of genes involved in extracellular matrix reorganization. Results: The application of ESP significantly improved wound healing rate, reduced inflammation, increased epidermal thickness, and promoted vessel formation in db/db mice, with efficacy similar to positive control group. The treatment also altered the expression levels of key genes, suggesting modulation of critical wound healing pathways. The obtained results confirm the wound healing potential of ESP on a type 2 diabetes mellitus model, and further investigation of *O. felinus* bioactive molecules is a promising research direction for future personalized approaches to therapy for chronic non-healing wounds.

Key words: wound healing, *Opisthorchis felinus*, excretory-secretory product, type 2 diabetes mellitus

Введение

Хронически незаживающие раны являются одним из основных осложнений сахарного диабета 1 и 2 типа [1], а количество бюджетных средств, затрачиваемых на их коррекцию может увеличиться минимум на 50 % к 2027 году [2]. Новым перспективным подходом к заживлению ран потенциально могут стать белки паразитических червей описторхид [3], включая *Opisthorchis felinus*, широко распространенного на территории Западной Сибири РФ. Данные черви обладают способностью снижать острое воспаление, вызванное гельминтной инвазией, и стимулировать восстановление поврежденных гельминтами тканей [4], а также способны стимулировать ранозаживление кожных покровов и ангиогенез [5]. Если кратко –

трематоды способны: (1) инициировать Th2 иммунный ответ [6], (2) имеют в своем составе антимикробные пептиды, близкие по своим свойствам антимикробным пептидам человека [5], (3) микробиом описторха содержит бактерии потенциально способные менять pH кожных покровов и инициировать иммунный ответ [4], (4) стимулируют ангиогенез [5]. Исследование ранозаживляющих свойств *O. felineus* позволяет оценить потенциальные механизмы действия и открывает перспективы на персонализированный терапевтический подход. Цель работы: изучение ранозаживляющих свойств экскреторно-секреторного продукта *Opisthorchis felineus* на мышах линии db/db (модель сахарного диабета 2 типа).

Экспериментальная часть

Получение экскреторно-секреторного продукта вкратце включало следующие этапы: инкубация взрослых особей *Opisthorchis felineus* ($n = 150$) в течение 24 часов с последующим сбором среды; последовательное центрифугирование; фильтрация и концентрирование с дальнейшей очисткой от эндотоксина.

Работа была проведена на двухмесячных мышах-самцах линии B.K.S.Cg Dock7 $\langle m \rangle +/+Lep^r \langle db \rangle /J$ (db/db), которые являются моделью сахарного диабета 2 типа [7]. Мышам были нанесены поверхностные раны диаметром 8 мм. Животные были разделены на 3 группы: неспецифический контроль (нейтральный гидрогель, 1.5 % метилцеллюлоза), специфический контроль (0.1 % PDGF) и ЭСП 10 мкг, очищенный от эндотоксина. Образцы кожи забирались на 4, 10 и 14 сутки от начала эксперимента для гистологического и ПЦР анализа. Гистологическая оценка включала в себя стандартную пробоподготовку [5] и включала следующие параметры: (1) площадь воспаления, наличие эпителиальных валиков, толщина эпидермиса, количество соединительной ткани в области раны; (2) количество новообразованных CD34+ сосудов, объемная плотность Col1a+ волокон в области раны. Так же была проведена оценка экспрессии генов, контролирующих реорганизацию внеклеточного матрикса. Выделение тотальной РНК, получение кДНК и постановка ПЦР были проведены по стандартному протоколу [5]. Гены *Gapdh* и *Hprt1* были выбраны в качестве эндогенного контроля. Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica 6.0 (Statsoft, США) и с использованием R.

Результаты

В результате исследования был выявлен ранозаживляющий потенциал экскреторно-секреторного продукта (ЭСП) *Opisthorchis felineus* на модели сахарного диабета 2 типа. Было показано, что нанесение ЭСП ускоряет заживление ран уже 7 сутки эксперимента и к 14 суткам процент застания раны достигает 95 %, достоверно отличаясь от группы неспецифического контроля. Полуколичественный анализ препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, показал, что в группе неспецифического контроля на 14 сутки эксперимента все образцы тканей, взятые из области раны, оставались на стадии пролиферации: наличие влажной корки, эпителиальных валиков и обширные области инфильтрации. В группе позитивного контроля образцы раневой ткани находились в стадии перехода от пролиферации к ремоделированию: отсутствие влажной корки, снижение участков инфильтрации. В группе ЭСП выявлены процессы реэпителизации: отсутствие влажной корки, закрытие эпителиальных валиков, правильное расположение слоев кожи и единичные участки инфильтрации (преимущественно грануляционная ткань) (рис. 1). Так же при иммуногистохимическом анализе было отмечено снижение количества CD34+ новообразованных сосудов к 14 суткам эксперимента в группе ЭСП, в отличие от групп контроля. Оценка процентного содержания соединительной ткани в области раны показала, что во всех группах этот показатель увеличивался к 14 суткам эксперимента. Однако в образцах тканей из группы ЭСП этот процент был достоверно ниже, чем в группа контроля.

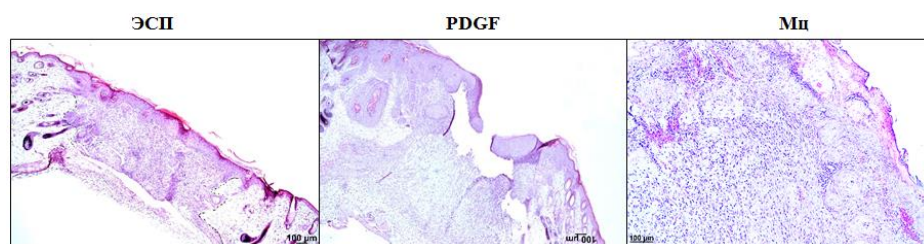


Рис. 1. Оценка заживления ран. Окраска гематоксилином-эозином, 14 сутки эксперимента, $\times 100$. В группе специфического лечения (ЭСП) детектируются процессы ре-эпителизации, четко визуализируются слои кожи. В группе положительного контроля (PDGF) наличие эпителиальных валиков. В группе метилцеллюлозы (Мц) корка, масштабные зоны инфильтрации

Это сопровождалось значительной активацией экспрессии гена α -гладкомышечного актина (*Acta2*) и синтезом значительного количества коллагена I (*Col1a1*) в группе специфического лечения по сравнению с группами контроля и неповрежденной кожи, что было так же подтверждено при иммуногистохимическом анализе. В группе ЭСП экспрессия генов, связанных с ремоделированием внеклеточного матрикса, *Tgfb1* и матриксных металлопротеиназ (*Mmp2*, *Mmp9*), была ближе к неповрежденной здоровой коже по сравнению с группами контроля. Таким образом, ЭСП *O. felineus* способны стимулировать образование коллагена и ремоделирование внеклеточного матрикса в области раны, что может свидетельствовать о качественной регенерации кожи. Так же была проведена иммуногистохимическая окраска на ЭСП *O. felineus* для подтверждения, что экскреторно-секреторный продукт действительно попадает в область раны при нанесении.

Заключение

Таким образом мы впервые продемонстрировали, что экскреторно-секреторный продукт *Opisthorchis felineus* обладает ранозаживляющими свойствами на модели сахарного диабета 2 типа. Кроме того, используя комплексный широкий морфологический подход, мы впервые показали, что ЭСП *O. felineus* способствуют: (i) ускорению сроков заживления ран; (ii) активации ангиогенеза; (iii) уменьшению воспаления и (iv) ремоделированию внеклеточного матрикса *in vivo*. Также мы использовали модель многократного нанесения для максимального эффекта и приближения к схемам лечения у человека.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-00082.

Список литературы

1. Okonkwo U.A., DiPietro L.A. Diabetes and Wound Angiogenesis // *Int J Mol Sci.* – 2017. – № 18 (7). – P. 1419.
2. Glover K. et al. 3D scaffolds in the treatment of diabetic foot ulcers: New trends vs. conventional approaches // *Int. J. Pharm.* – 2021. – № 599. – P. 120423.
3. Huang H. et al. Immunotherapy for type 1 diabetes mellitus by adjuvant-free *Schistosoma japonicum*-egg tip-loaded asymmetric microneedle patch (STAMP) // *J Nanobiotechnology.* – 2022. – № 20 (1). – P. 377.
4. Pakharukova M.Y. et al. *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis felineus* liver flukes affect mammalian host microbiome in a species-specific manner // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2023. – № 17 (2). – P. e0011111.
5. Kovner A.V. et al. Wound healing approach based on excretory-secretory product and lysate of liver flukes // *Sci Rep.* – 2022. – № 12 (1). – P. 21639.
6. Quinteros S.L. et al. Exploring the role of macrophages in determining the pathogenesis of liver fluke infection // *Parasitology.* – 2022. – № 149 (10). – P. 1364–1373.
7. Stachura A. et al. Wound Healing Impairment in Type 2 Diabetes Model of Leptin-Deficient Mice-A Mechanistic Systematic Review // *Int J Mol Sci.* – 2022. – № 23 (15). – P. 8621.

УДК 616.995.122

Состав микробиоты кишечника при холангиокарциноме: пилотные данныеА.Е. Ковширина, Т.С. Соколова, В.В. Куленич

Научный руководитель: профессор, д.м.н., О.С. Федорова

Сибирский государственный медицинский университет

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

E-mail: anna.evgenjevna.kovshirina@gmail.com**Gut microbiota composition in cholangiocarcinoma: pilot data**A.E. Kovshirina, T.S. Sokolova, V.V. Kulenich

Supervisor: Prof., Dr., O.S. Fedorova

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

E-mail: anna.evgenjevna.kovshirina@gmail.com

Abstract. *In present study we aimed to characterize the taxonomic composition of the gut microbiota in patients with cholangiocarcinoma (CCA) compared to controls. To solve the problems of this project, we used an integrated approach including medical history, ultrasound and parasitologic methods, gut microbiota amplicon sequencing, bioinformatic and statistical data analysis. Bacterial DNA isolation from stool samples for metagenomic analysis was carried out, gut microbiota was studied in patients with CCA and control group using bacterial 16S rRNA gene sequencing technology. The study established a significantly higher representation of the class of bacteria Betaproteobacteria, family Alcaligenaceae, as well as genera Ruminococcus, Sutterella of family Coriobacteriaceae and genera Ruminococcus, Sutterella of family Coriobacteriaceae in patients with CCA compared to the control group. Thus, for the first time, pilot data on the taxonomic composition of the intestinal microbiota in patients with cholangiocarcinoma compared to individuals without cancer have been obtained. This has important practical significance for the development of new technologies for predicting the risk of hepatobiliary cancer.*

Key words: *cholangiocarcinoma (CCA), gut microbiota composition, amplicon sequencing of bacterial DNA, bioinformatics analysis.*

Введение

В соответствии с мировой статистикой, рак печени занимает шестую позицию среди наиболее распространенных локализаций злокачественных новообразований [1].

Холангиоцеллюлярный рак (ХК) является наиболее значимым социально-экономическим бременем вследствие агрессивности, отсутствия специфических симптомов, длительного бессимптомного течения и способов доклинической диагностики, резистентности к терапии [2, 3].

Согласно данным клинических и экспериментальных исследований, кишечная микробиота является важнейшим фактором развития заболеваний печени по оси кишечник-печень [4, 5]. Воспалительные реакции, возникающие вследствие изменения микробиома кишечника, ассоциированы с развитием ряда хронических неинфекционных заболеваний, а также рассматриваются в качестве потенциального канцерогенного механизма [6–9]. Однако фундаментальные механизмы, которые обуславливают эту взаимосвязь, остаются до сих пор неясными.

Таким образом, представляет интерес охарактеризовать таксономический состав кишечной микробиоты у пациентов с ХК сравнению с индивидуумами без онкопатологии.

Цель исследования: изучить особенности таксономического состава микробиоты кишечника у пациентов с холангиокарциномой.

Материалы и методы исследования

Выполнено одномоментное сравнительное исследование «случай-контроль» при поддержке Российского научного фонда, грант «Изменение микробиоты кишечника как фактор прогрессирования перидуктального фиброза и развития холангиокарциномы» (№ 23-25-00432). Рекрутированы участники ранее проведенных проектов.

Сформированы следующие исследуемые группы: 1 – пациенты с ХК ($n = 30$); 2 – контрольная группа ($n = 30$).

Всем участникам исследования выполнены УЗИ гепатобилиарной системы («Mindray M7», Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics, Co, Ltd) и микроскопия 2-х образцов стула методом «Parasep» (DiaSys Ltd, UK).

Исследование микробиоты кишечника проведено методом ампликонного секвенирования, биоинформатический и статистический анализ полученных данных. Проведено выделение бактериальной ДНК из образцов стула для метагеномного анализа, исследована микробиота кишечника у пациентов с ХК и группой контроля с использованием технологии секвенирования гена бактериальной 16S рРНК (Illumina MiSeq).

Биоинформатический анализ полученных прочтений проведен с использованием программного обеспечения Qiime 2. Данные агрегированы в ASVs (amplicon sequence variants) с использованием плагина DADA2. Таксономический анализ выполнен с применением плагина RDP classifier и базы данных таксономий Silva. Индексы альфа и бета-разнообразия рассчитаны с использованием Qiime 2.

Статистический анализ выполнен с использованием языка R 4.3.1.

Результаты

Сформированы клинические группы пациентов ($n = 120$; 53 % мужчин и 47 % женщин). Средний возраст всех участников $53,1 \pm 1,6$ года. Исследуемые группы сопоставимы по полу и возрасту: пациенты с ХК ($n = 30$; 62,5 % мужчин и 37,5 % женщин), средний возраст $63 \pm 2,2$ лет. Контрольная группа ($n = 30$; по 50 % мужчин и женщин), средний возраст $48 \pm 3,4$ лет.

У больных ХК чаще встречались такие симптомы, как желтуха, абдоминальная боль, вздутие, гепатомегалия, болезненность печени при пальпации, пузырьные симптомы по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). На УЗИ гепатомегалия, новообразования в печени, утолщение и неровность стенки желчного пузыря, холелитиаз, перидуктальный фиброз, а также расширение и структурные изменения желчных протоков также обнаруживались статистически значимо чаще в группе пациентов с ХК ($p < 0,05$).

В результате оценки альфа-разнообразия по индексу Chao1 выявлено увеличение таксономического разнообразия ($U = 430$, $p = 0,021$) у пациентов с ХК по сравнению с группой контроля. По индексу разнообразия Шеннона различия между группами не были значимы ($U = 392$, $p = 0,123$).

Наиболее представленными типами в образцах микробиоты пациентов с ХК были *Firmicutes* (72,5 %), *Bacteroidetes* (18,1 %), *Proteobacteria* (2,5 %), *TM7* (2,4 %), *Actinobacteria* (1,2 %). В группе контроля также преобладающими типами были *Firmicutes* (75,3 %), *Bacteroidetes* (14,6 %), *Proteobacteria* (2,7 %), *TM7* (2,8 %), *Actinobacteria* (1,1 %).

На уровне семейств у пациентов с ХК преобладали *Ruminococcaceae* (52,44 %), *Bacteroidaceae* (11 %), *Lachnospiraceae* (5,3 %), *Clostridiaceae* (3,1 %) и *Veillonellaceae* (2 %). В образцах контрольной группы наиболее представлены семейства *Ruminococcaceae* (56%), *Bacteroidaceae* (12 %), *Clostridiaceae* (3,8 %), *Lachnospiraceae* (2,9 %) и *Veillonellaceae* (2,6 %).

На уровне родов в исследуемых группах преобладали *Faecalibacterium* (45,1 %), *Bacteroides* (11,8 %), *U(f__Ruminococcaceae)* (4,4 %), *SMB53* (2,9 %), *U(f__Lachnospiraceae)* (1,9 %). Среди наиболее представленных видов идентифицированы *Faecalibacterium rausnitzii* (45 %), *U(g__Bacteroides)* (10 %), *U(f__Ruminococcaceae)* (4,4 %).

Для сравнительной оценки состава микробиоты кишечника между исследуемыми группами определены таксоны, которые встречаются более чем в 10 % образцов и составляют не менее 0,2 % от состава микробиоты в каждом образце. В результате сравнительного анализа у пациентов с ХК выявлено увеличение представленности класса бактерий *Betaproteobacteria* ($p = 0,02$), семейства *Alcaligenaceae* ($p = 0,02$) в сравнении с участниками контрольной группы. На уровне родов и видов в образцах микробиоты пациентов с ХК обнаружено более высокое содержание *Ruminococcus* ($p = 0,01$), *Sutterella* ($p = 0,01$), *U(f__Coriobacteriaceae)* ($p = 0,01$), *U(g__Ruminococcus)* ($p = 0,02$), *U(g__Sutterella)* ($p = 0,01$), *U(f__Coriobacteriaceae)* ($p = 0,01$), чем в группе контроля.

Заключение

Таким образом, в ходе реализации первого этапа проекта впервые охарактеризован таксономический состав кишечной микробиоты у пациентов с ХК. Выявлены особенности состава микробиоты в виде увеличения альфа-разнообразия и изменения представленности отдельных бактерий на разных таксономических уровнях у пациентов с ХК в сравнении с контрольной группой. Однако необходимы дальнейшие исследования для изучения роли микробиома кишечника в канцерогенезе злокачественных опухолей гепатобилиарного тракта. Полученные данные будут иметь важное практическое значение для разработки новых технологий прогнозирования данной патологии.

Список литературы

1. GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 // *Lancet*. – 2016. – Vol. 388, № 10053. – P. 1459–1544.
2. Banales J.M., Cardinale V., Carpino G., et al. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA) // *National Reviews Gastroenterology & Hepatology*. – 2016. – Vol. 13, № 5. – P. 261–280.
3. WHO. Life expectancy and leading causes of death and disability // WHO's Global Health Estimates, 2020. – URL: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>
4. Meng C., Bai C., Brown T.D., Hood L.E., Tian Q. Human Gut Microbiota and Gastrointestinal Cancer // *Genomics Proteomics Bioinformatics*. – 2018. – Vol. 16, №1. – P. 33–49.
5. Adolph T.E., Grander C., Moschen A.R., Tilg H. Liver-Microbiome Axis in Health and Disease // *Trends Immunology*. – 2018. – Vol. 39, № 9. – P. 712–723.
6. Kummel M., Hov J.R. Response to “Faecal microbiota profiles as diagnostic biomarkers in primary sclerosing cholangitis” by Rühlemann et al. // *Gut*. – 2017. – Vol. 66, № 4. – P. 755–756.
7. Tiwari P., Dwivedi R., Bansal M., Tripathi M., Dada R. Role of Gut Microbiota in Neurological Disorders and Its Therapeutic Significance // *Journal of Clinical Medicine*. – 2023. – Vol. 12, № 4. – P. 1650.
8. Ni J., Huang R., Zhou H., et al. Analysis of the Relationship Between the Degree of Dysbiosis in Gut Microbiota and Prognosis at Different Stages of Primary Hepatocellular Carcinoma // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – № 10. – P. 1458.
9. Imhann F., Vich Vila A., Bonder M.J., et al. Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease // *Gut*. – 2018 – Vol. 67, № 1. – P. 108–119.

УДК 571.27: 578.74

**Неспецифическое выявление IgG антител к антигенам SARS-CoV-2 и вирусу гриппа
при термоинактивации сывороток крови человека и животных**

А.Д. Костромитина, В.А. Матюшенко, А.Я. Рак

Научный руководитель: д.б.н., член-корреспондент РАН, И.Н. Исакова-Сивак

Институт экспериментальной медицины

Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12, 197376

E-mail: arina8goshina@gmail.com

**Non-specific detection of IgG antibodies to SARS-CoV-2 and influenza virus antigens
by thermal inactivation of human and animal sera**

A.D. Kostromitina, V.A. Matyushenko, A.Y. Rak

Scientific Supervisor: Dr., Corresponding Member of RAS, I.N. Isakova-Sivak

Institute of Experimental Medicine, Russia, St. Petersburg, Akademika Pavlova str., 12, 197376

E-mail: arina8goshina@gmail.com

Abstract. *Determining the levels of serum antibodies to the new SARS-CoV-2 coronavirus is a necessary tool for assessing humoral immunity in people who recovered from COVID-19 or were vaccinated with specific vaccines, as well as the immune response to viral antigens in laboratory animals. Blood sera of infected people and animals are considered potentially contagious material, and thermal inactivation of samples at 56 °C is a possible method of reducing the risk of infection of personnel during serological studies. However, this procedure may affect the performance of virus-specific IgG and IgM class antibodies, making it difficult to interpret the results obtained. Here we demonstrated that thermal inactivation of serum samples of SARS-CoV-2 and influenza naïve individuals could lead to false positive results, thus underscoring the importance of serum handling procedures while performing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with SARS-CoV-2 and influenza virus antigens. We suggest treatment of the sera with a receptor-destroying enzyme to counteract the effect of nonspecific binding of IgG antibodies to these antigens.*

Key words: SARS-CoV-2; influenza; ELISA; heat inactivation; serum antibody; receptor-destroying enzyme.

Введение

Коронавирусы SARS-CoV-2 и вирусы гриппа способны вызывать лёгкие или тяжёлые респираторные инфекции у различных видов животных и у человека [1, 2]. При анализе вирусспецифического иммунитета после естественной инфекции и вакцинации основное внимание уделяется оценке гуморального иммунного ответа, так как антитела к поверхностным антигенам вирусов играют решающую роль в предотвращении проникновения вируса в клетку-хозяина [3]. В исследованиях уровня антител к SARS-CoV-2 сыворотки крови человека и животных считаются потенциально инфекционным материалом, поэтому для снижения риска заражения персонала рекомендуется термическая инаktivация образцов при 56 °C в течение 1 часа. Известно, что тепловая инаktivация может оказывать влияние на результаты некоторых иммуноанализов, в том числе в коммерческих тест-системах и при использовании лабораторного метода иммуноферментного анализа (ИФА). В доклинических и клинических испытаниях вакцин против SARS-CoV-2 термическая инаktivация сывороток крови человека и животных может привести к риску возникновения невалидных ложноположительных результатов, поэтому важно оценить степень влияния такой обработки при проведении серологических тестов. Сирийские хомячки являются наиболее широко используемой моделью для изучения вирусспецифических иммунных реакций к SARS-CoV-2 и гриппу, поскольку восприимчивы к обеим инфекциям и способны повторять клинические признаки заболеваний [4, 5]. Таким образом, целью настоящего исследования явилась оценка влияния тепловой инаktivации

сывороток крови людей и сирийских хомячков на связывание IgG-антител с антигенами SARS-CoV-2 и вируса гриппа, а также возможности устранения ложноположительных результатов обработкой образцов сывороток крови рецептор-разрушающим ферментом (receptor-destroying enzyme; RDE).

Экспериментальная часть

В исследовании использовали иммунные сыворотки крови человека и сирийских хомячков, содержащие вирусспецифические IgG антитела к SARS-CoV-2 и вирусу гриппа. В состав контрольных групп были включены образцы наивных сывороток крови человека и животных, не имевших контакта с соответствующим патогеном.

Все взятые образцы анализировали в трёх вариантах: (i) необработанные (нативные) образцы; (ii) термоинактивированные образцы (56 °C, 1 час на водяной бане); и (iii) образцы, обработанные RDE (Denka Seiken, Токио, Япония), согласно инструкции производителя.

Уровни сывороточных IgG-антител оценивали с помощью ИФА с использованием рекомбинантного белка рецептор-связывающего домена S-белка (RBD) и цельного вируса гриппа, очищенного на градиенте плотности сахарозы. В качестве стандарта были выбраны разведения 1:20 и 1:200 для наивных и иммунных образцов сывороток крови человека и хомячков, соответственно. Полученные значения оптической плотности (ОП) из выбранных разведений использовались для статистических расчётов с использованием критерия Уилкоксона для попарного сравнения (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). Различия считались значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты

Анализ неиммунных сывороток человека и сирийских хомячков показал, что их тепловая инактивация при 56 °C приводила к достоверному усилению сигнала в ИФА как в случае антигена SARS-CoV-2, так и при использовании цельного вируса гриппа в качестве антигенной подложки (рис. 1), что указывает на потенциальную возможность детекции ложноположительных результатов при рутинном тестировании сывороток крови методом ИФА. Однако обработка сывороток с помощью RDE полностью устраняла эффект неспецифического связывания IgG антител с вирусными антигенами (рис.1).

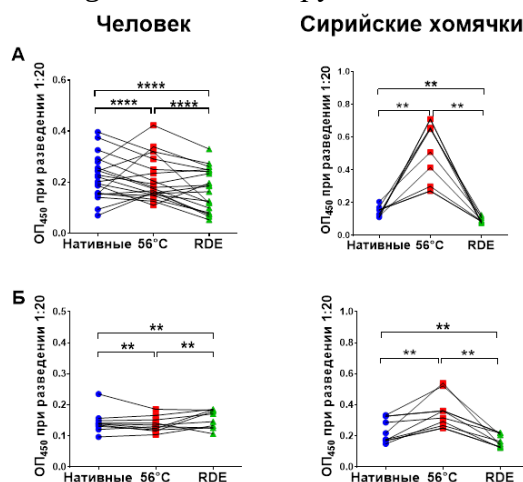


Рис. 1. Уровни IgG-антител к RBD белку SARS-CoV-2 (А) и вирусу гриппа (Б) в неиммунных сыворотках крови человека (левая панель) и сирийских хомячков (правая панель). ОП — оптическая плотность. Достоверность различий между исследуемыми группами, ** $p < 0,01$, **** $p < 0.0001$

Для иммунных сывороток животных также был показан негативный эффект тепловой инактивации для обоих вирусных антигенов (Рис. 2. А, Б), тогда как прогревание сывороток людей приводило к значительному усилению сигнала в случае гриппозного антигена, но не коронавирусного (рис. 2. Б). Тем не менее, обработка образцов иммунных сывороток крови

человека и хомячков RDE полностью нивелировала эффект тепловой инактивации, достоверно снижая уровень сигнала в иммуноферментном анализе.

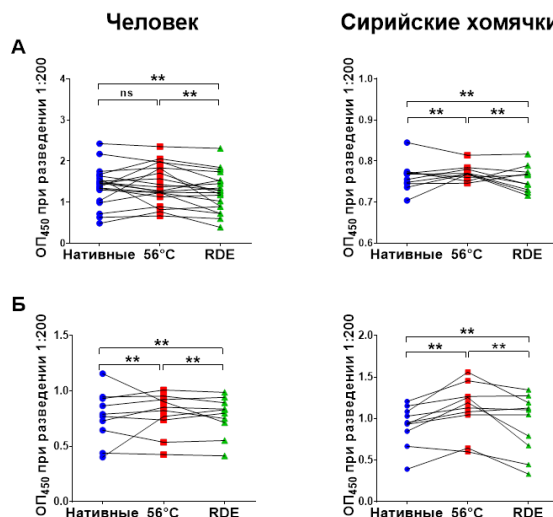


Рис. 2. Уровни IgG-антител к RBD белку SARS-CoV-2 (А) и вирусу гриппа (Б) в иммунных сыворотках крови человека (левая панель) и сирийских хомячков (правая панель). n.s. — достоверных различий нет, ** $p < 0,01$

Заключение

В настоящем исследовании был продемонстрирован эффект неспецифического связывания IgG антител с антигенами SARS-CoV-2 и вируса гриппа при термоинактивации неиммунных сывороток крови человека и сирийских хомячков. В основе возникновения ложноположительных результатов в ИФА при термической обработке сывороток может лежать феномен структурной перестройки иммуноглобулиновых комплексов с образованием конгломератов IgG-антител, способных влиять на avidность комплекса антиген-антитело [6]. В рамках данного исследования было показано, что обработка образцов сывороток крови рецептор-разрушающим ферментом способна устранить эффект неспецифического связывания сывороточных IgG-антител к обоим тестируемым вирусам. Соответственно, предварительную обработку RDE можно рассматривать как один из этапов подготовки потенциально инфекционных сывороток крови к серологическим тестированиям.

Работа поддержана грантом РНФ №21-75-30003.

Список литературы

1. Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 // Nature reviews. Microbiology. – 2021. – Vol. 19, № 3. – P. 141–154.
2. Iuliano A.D., Roguski K.M., Chang H.H., Muscatello D.J., Palekar R., et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study // Lancet. – 2018. – Vol. 391. – P. 1285–1300.
3. Sui Y., Bekele Y., Berzofsky J.A. Potential SARS-CoV-2 Immune Correlates of Protection in Infection and Vaccine Immunization // Pathogens. – 2021. – Vol. 10, № 2 – P. 138.
4. Shou S., Liu M., Yang Y., Kang N., Song Y., et al. Animal Models for COVID-19: Hamsters, Mouse, Ferret, Mink, Tree Shrew, and Non-human Primates // Frontiers in microbiology. – 2021. – Vol. 12, № 626553.
5. Iwatsuki-Horimoto K., Nakajima N., Ichiko Y., Sakai-Tagawa Y., et al. Syrian Hamster as an Animal Model for the Study of Human Influenza Virus Infection // Journal of virology. – 2018. – Vol. 92, № 4.
6. Muratsugu M. Mechanism of aggregates generated by heating human serum // Biological & pharmaceutical bulletin. – 1996. – Vol. 19, № 1. – P. 132–135.

УДК: 616.24-006: 575.224.23

**Влияние изменения экспрессии и aberrаций числа копий ДНК в генах системы
гомологичной рекомбинации на отдаленные результаты лечения больных
первично-операбельным раком легкого**

Е.А. Кравцова, И.А. Цыденова, М.К. Ибрагимова

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

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

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

E-mail: zdereva.e@gmail.com

**Effect of changes in expression and DNA copy number aberrations
in genes of the homologous recombination system on the long-term results
of treatment of patients with primary operable lung cancer**

E.A. Kravtsova, I.A. Tsydenova, M.K. Ibragimova

Scientific Supervisor: PhD., M.M. Tsyganov

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of
Sciences. Russia, Tomsk, Kooperativny Lane, 5, 634009

E-mail: zdereva.e@gmail.com

Abstract. *To date, when building treatment tactics for primary inoperable non-small cell lung cancer (NSCLC), "platinum duplexes" are predominantly favoured as the most effective treatment regimen. But as a number of studies have shown, some patients do not respond to standard chemotherapy, which may be due to high DNA repair activity. In this case, the presence of DNA repair deficiency associated with disorders in the major genes of the homologous recombination system can be good predictive and prognostic markers in breast cancer. As for other localisations, the use of DNA-damaging drugs in patients with non-small cell lung cancer is a standard treatment, and the effect of homologous recombination deficiency in these patients on treatment is poorly studied, which makes the choice of this particular model for the study highly relevant.*

Key words: *non-small cell lung cancer, adjuvant chemotherapy, copy number aberration, homologous recombination genes.*

Введение

Многочисленные исследования показали, что формирование дефицита гомологичной рекомбинации (ДГР) за счет нарушений в генах *BRCA1/2* характерно не только для рака молочной железы и рака яичников, но и для других локализаций, в частности для немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). Однако связь aberrантных состояний генов системы гомологичной рекомбинации с эффективностью лечения при раке легкого изучена слабо. Изучение экспрессионного профиля генов гомологичной рекомбинации и наличия хромосомных aberrаций в них позволит в полной мере изучить дефицит гомологичной рекомбинации у пациентов с немелкоклеточным раком легкого и выявить новые прогностические маркеры. Таким образом, целью проведенного исследования является оценка связи экспрессии и aberrаций числа копий ДНК в основных генах гомологичной рекомбинации с показателями безметастатической выживаемости (БМВ).

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 104 больных немелкоклеточным раком легкого IIВ-IIIВ стадий, центральной или периферической локализации. Всем пациентам проводилась операция в объеме пневмонэктомии или лобэктомии. После хирургического вмешательства была проведена адъювантная химиотерапия «платиновыми дуплетами».

В качестве исследуемого материала был использован операционный материал опухолевой ткани легкого после химиотерапии. Для анализа aberrаций числа копий (CNA) ДНК исследуемых генов проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array. Оценку экспрессии основных генов гомологичной рекомбинации проводили при помощи количественной ПЦР. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 8.0» (StatSoft Inc., USA).

Результаты

Для выявления связи показателей экспрессии исследуемых генов с выживаемостью были использованы статистические характеристики выборки по уровню экспрессии. В результате проведения исследования было получено две группы анализа: 1 – группа пациентов с гиперэкспрессией генов (экспрессия более 1) и 2 – группа пациентов с гипоекспрессией (экспрессия менее 1). Далее с использованием метода Каплана-Майера было установлено, что уровень экспрессии статистически значимо не влияет на показатели безметастатической выживаемости. В ходе анализа была показана связь лишь для гена *RAD51C* (рис. 1). При этом, гипоекспрессия связана с более высокими показателями выживаемости (log-rank test $p = 0,003$). Также было установлено, что гипоекспрессия гена *RAD51C* связана с высокими показателями безметастатической выживаемости (log-rank test $p = 0,003$) (рис. 1).

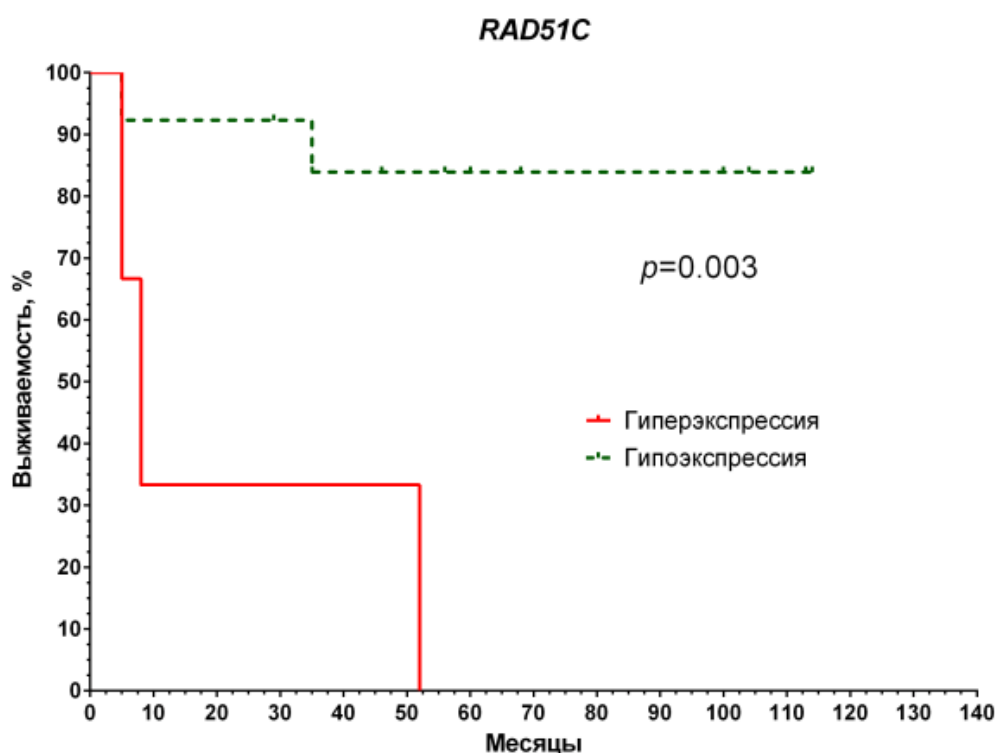


Рис. 1. Связь экспрессии гена *RAD51C* с безметастатической выживаемостью

При оценке показателей безметастатической выживаемости в зависимости от наличия aberrаций числа копий ДНК исследуемых генов было показано, что нормальная копияность, равно как и делеция в гене *PPP2R2A* определяет 86 % 5-летнюю выживаемость, по сравнению с группой пациентов, имеющих амплификацию (50 %), при $p = 0,01$ (рис. 2А). Аналогичный результат был получен для гена *BARD1* ($p = 0,1$). При этом, делеция гена *BRCA2* связана с низкой 53 % выживаемостью (log-rank test $p = 0,0003$), равно как и делеция

гена *PALB2* (показатель безметастатической выживаемости 50 %, при $p = 0,05$), по сравнению с группой больных с нормальной копийностью данных генов (рис. 2Б, рис. 2В).

Стоит отметить, что в гене *BRCA1*, делеция определяет 100 % безметастатическую выживаемость больных немелкоклеточным раком легкого (log-rank test $p = 0,03$) при амплификации – 81 %, при нормальной копийности – 84 % (рис. 2Г).

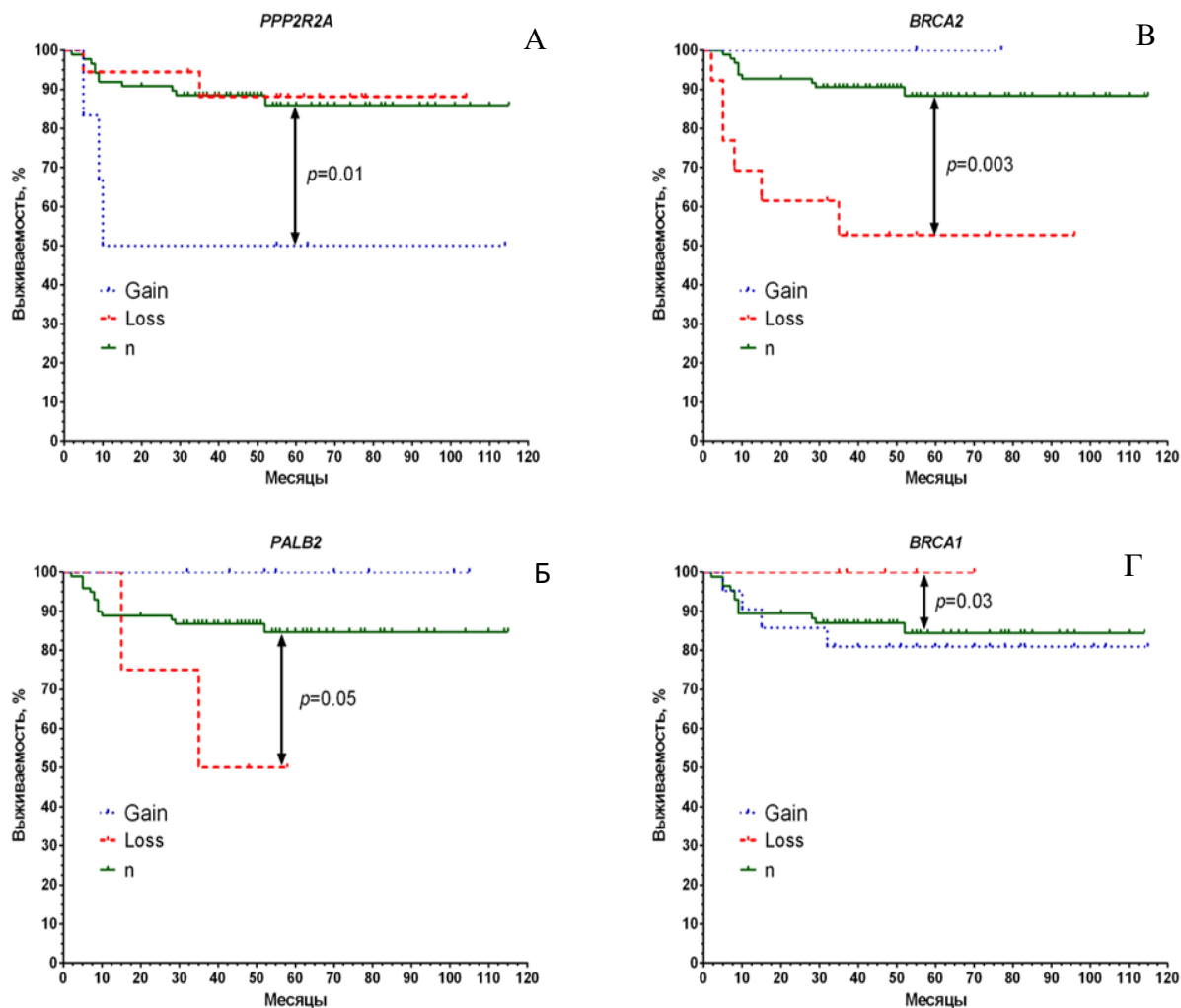


Рис. 2. Связь наличия aberrаций числа копий ДНК генов *PPP2R2A* (А), *BRCA2* (Б), *PALB2* (В), *BRCA1* (Г) в опухоли легкого с прогнозом заболевания

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования, была показана роль экспрессии и хромосомных aberrаций генов гомологичной рекомбинации в отдаленных результатах лечения больных немелкоклеточным раком легкого. Полученные данные имеют значительную практическую значимость для оценки чувствительности и формирования резистентности опухолей к ДНК-повреждающим химиопрепаратам, широко используемым в лечении онкологических заболеваний разных локализаций, что поможет в их персонализированном назначении.

Работа поддержана грантом РНФ 22-15-00169.

УДК 576.385, 547.913.5

Нейропротекторные свойства артемизинина *in vitro*

В.С. Крышкова^{1,2}, С.А. Пухов^{1,2}, М.С. Кухарский^{1,2}

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

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова
Россия, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1, 117997

²Институт физиологически активных веществ Федерального исследовательского центра
проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук
Россия, г. Черноголовка, Северный проезд, 1, 142432

E-mail: yskryshkova@mail.ru

Neuroprotective properties of artemisinin *in vitro*

V.S. Kryshkova^{1,2}, S.A. Pukhov^{1,2}, M.S. Kukharsky^{1,2}

Scientific Supervisor: Dr., M.S. Kukharsky

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Russia, Moscow,
Ostrovityanova str., 1, 117997

²Institute of Physiologically Active Compounds of the Federal Research Center of Problems
of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russia, Moscow region, Chernogolovka,
Severnoy Proezd, 1, 142432

E-mail: yskryshkova@mail.ru

Abstract. *Neuron death in neurodegenerative diseases is often associated with protein misfolding and aggregation, as well as mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species, which leads to the development of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress, respectively. Artemisinin is a sesquiterpene lactone with an endoperoxide bridge known as an effective antimalarial agent. It's potential neuroprotective properties are also under investigation. In our study, artemisinin demonstrated a stimulating effect on neuronal cells. It also showed a protective effect against ER stress induced by the selective inhibitor of the 26S proteasome MG132, but not against oxidative stress induced by sodium arsenite (NaAsO₂) in SH-SY5Y cells.*

Key words: *artemisinin, neurodegenerative diseases, neuroprotection, ER stress, oxidative stress.*

Введение

Артемизинин и его производные относятся к классу сесквитерпеновых лактонов, содержащих пероксидный мостик. На основе этого вторичного метаболита полыни однолетней (*Artemisia annua*) получены эффективные противомаларийные препараты первой линии терапии, которая характеризуется хорошей переносимостью и отсутствием выраженных побочных эффектов. После своего открытия артемизинин стал предметом изучения с целью использования в борьбе с другими паразитарными инфекциями, а также для разработки на его основе противоопухолевых препаратов [1]. Ряд исследований демонстрирует стимулирующий и нейропротекторный эффект артемизинина на клеточных культурах, в том числе в условиях клеточного стресса, но механизмы, обеспечивающие данные свойства, остаются неизвестными [2–4].

Нейродегенеративные заболевания имеют разные механизмы развития и варианты клинических проявлений, однако у них есть общие патогенетические признаки. Гибель нейронов в определенных зонах мозга является одной из основных причин развития нейропатологии. Потеря нейронов связана с накоплением в них неправильно свернутых или агрегированных белков, что приводит к нарушению белкового гомеостаза, а также митохондриальной дисфункции и выработке активных форм кислорода, что вызывает формирование стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР-стресса) и оксидативного стресса, соответственно [5, 6]. Поиск новых соединений, способных влиять на ключевые

звенья патогенеза нейродегенеративных заболеваний, имеет большое значение для разработки новых методов терапии таких социально значимых заболеваний как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др. Целью данного исследования являлось изучение потенциального нейропротекторного действия артемизинина на клетках нейронального типа, в том числе при ЭПР-стрессе и оксидативном стрессе.

Материалы и методы исследования

В работе использовали культуру клеток нейробластомы человека SH-SY5Y и клетки почки эмбриона человека HEK293, а также первичную нейрональную культуру. Клетки инкубировали с артемизинином в разных концентрациях на протяжении 48 часов. Далее проводили оценку жизнеспособности клеток с использованием MTS-теста и/или ресазурина, представляющих собой колориметрические тесты для оценки метаболической активности клеток на основе их восстановительной способности. Для моделирования клеточного стресса через 24 часа после посева к культурам SH-SY5Y добавляли селективный ингибитор 26S протеасом MG132 в концентрации 1 мкМ, что приводило к развитию ЭПР-стресса, или 50 мкМ метаарсенита натрия (SA), вызывающего оксидативный стресс. Первичные нейрональные культуры получали из гиппокампов новорожденных мышей линии C57Bl. Для анализа количества нейронов проводили иммуноцитохимическое окрашивание с использованием антител против маркера NeuN с последующим подсчетом окрашенных клеток.

Результаты

Артемизинин оказывал стимулирующий эффект на жизнеспособность клеток SH-SY5Y через 48 часов после добавления в среду в концентрации 1 мкМ. В концентрации 250 мкМ и выше артемизинин оказывал выраженный цитотоксический эффект (рис. 1. А). Рассчитанное значение IC₅₀ составило 180 мкМ. Исследование действия артемизинина на линии клеток HEK293, показало, что стимулирующий эффект проявляется в нескольких дозах от 1 до 100 мкМ, однако не через 48 часов культивирования, а через 24 часа. Известно, что для клеток линии HEK293 характерно меньшее время удвоения (между 24 и 45 часами) в сравнении с SH-SY5Y (приблизительно 48 часов). Таким образом, результаты этих экспериментов можно объяснить тем, что артемизинин стимулирует пролиферацию клеток.

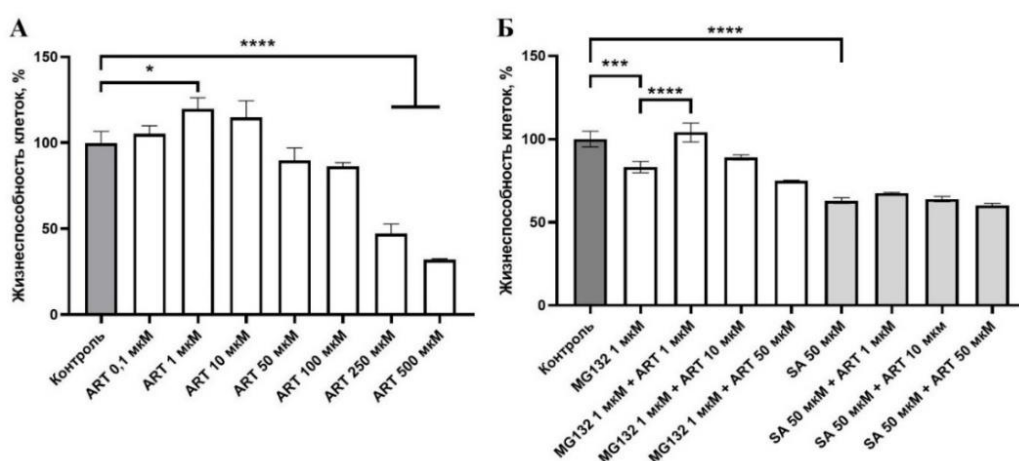


Рис. 1. Влияние артемизинина (ART) на жизнеспособность клеток SH-SY5Y в нормальных условиях инкубирования через 48 часов (А) и в условиях развития клеточного стресса при действии MG132 или метаарсенита натрия (SA) (Б)

Для дальнейшего исследования действия артемизинина при клеточном стрессе на клетках SH-SY5Y использовались нетоксичные концентрации 1, 10 и 50 мкМ. Действие MG132 и метаарсенита натрия на клетки SH-SY5Y приводило к снижению жизнеспособности на 20 % и 40 %, соответственно (рис. 1. Б). Артемизинин оказывал нейропротекторное

действие при ЭПР-стрессе в концентрации 1 мкМ, нормализуя значение выживаемости до уровня контроля. Примечательно, что при оксидативном стрессе артемизинин не оказывал никакого эффекта на выживаемость клеток SH-SY5Y во всех исследованных концентрациях.

Далее действие артемизинина было протестировано на первичной гиппокампальной культуре, полученной от мышей. Инкубация с артемизинином проводилась с момента посева первичной культуры и на протяжении первых 7 дней, за которые происходит дифференцировка нейронов и глии. В данных условиях токсическое действие артемизинина проявилось, начиная с концентрации 10 мкМ, тогда как при концентрации 1 мкМ артемизинин не влиял на жизнеспособность клеток. Стимулирующего эффекта артемизинина на первичных культурах не наблюдалось. Однако иммуоцитохимический анализ показал, что артемизинин приводит к увеличению доли зрелых нейронов в культуре после 7 дней инкубации в концентрации 1 мкМ.

Заключение

Артемизинин продемонстрировал стимулирующий эффект по отношению к нейрональным клеткам SH-SY5Y. Артемизинин также оказал защитное действие при ЭПР-стрессе, вызванном обработкой MG132, тогда как при оксидативном стрессе такого эффекта не наблюдалось. Это может говорить о селективности действия артемизинина по отношению к типу клеточного стресса. Более того, артемизинин продемонстрировал способность стимулировать выживаемость и/или дифференцировку нейронов в первичных нейрональных культурах мыши. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что артемизинин обладает протекторной активностью по отношению к клеткам нейронального типа, в том числе в условиях развития клеточного стресса, наличие которого характерно для ряда патологических состояний нервной системы, в частности нейродегенеративных заболеваний. Необходимо проведение дальнейших более детальных исследований для выявления конкретных механизмов действия артемизинина на нервные клетки, а также тестирование этого природного сесквитерпенового лактона и его производных в качестве основы при разработке потенциального лекарственного препарата для лечения заболеваний нервной системы.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИФАВ РАН (тема № FFSG-2024-0021).

Список литературы

1. Krishna S., Bustamante L., Haynes R.K., Staines H.M. Artemisinins: their growing importance in medicine // Trends Pharmacol Sci. – 2008. – V. 29, № 10. – P. 520–527.
2. Sarina, Yagi Y., Nakano O., Hashimoto T., Kimura K., Asakawa Y., Zhong M., Narimatsu S., Gohda E. Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by artemisinin through activation of ERK and p38 MAPK signaling pathways // Brain Res. – 2013. – V. 1490. – P. 61–71.
3. Yan J., Ma H., Lai X., Wu J., Liu A., Huang J., Sun W., Shen M., Zhang Y. Artemisinin attenuated oxidative stress and apoptosis by inhibiting autophagy in MPP⁺-treated SH-SY5Y cells // J Biol Res (Thessalon). – 2021. – V. 28, № 6.
4. Zhao X., Fang J., Li S., Gaur U., Xing X., Wang H., Zheng W. Artemisinin Attenuated Hydrogen Peroxide (H₂O₂)-Induced Oxidative Injury in SH-SY5Y and Hippocampal Neurons via the Activation of AMPK Pathway // Int J Mol Sci. – 2019. – V. 20, №1 1. – P. 2680.
5. Кухарский М.С., Эверетт М.У., Лыткина О.А., Распопова М.А., Ковражкина Е.А., Овчинников Р.К., Антохин А.И., Московцев А.А. Нарушение белкового гомеостаза в клетке как основа патогенеза нейродегенеративных заболеваний // Молекулярная биология. – 2022. – Т. 56, № 6. – С. 1044–1056.
6. Johri A., Beal M.F. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases // J Pharmacol Exp Ther. – 2012. – V. 342, № 3. – P. 619–630.

УДК 612 821 2

**Пространственно-временные характеристики ЭЭГ в процессе решения
невербальных задач в контроле и при действии одорантов**Ю.Л. Кундупьян

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

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Южный федеральный университет
Россия, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1E-mail: ylkundupyan@sfedu.ru**Spatiotemporal characteristics of the EEG in the process of solving
nonverbal problems in control and under the influence of odorants**I.L. Kundupyan

Scientific Supervisor: PhD., E.K. Aydarkin

I.D. Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnology, Southern Federal University
Russia, Rostov-on-Don, st. Stachki, 194/1E-mail: ylkundupyan@sfedu.ru

Abstract. We studied the spatiotemporal characteristics of the EEG when solving nonverbal tasks in control and in the presence of odorants of different directions, such as rosemary, melissa and lavender. The study showed that aromas improved the quality of activity compared to controls, especially with lavender, which activated the brainstem and subcortex, and also involved working memory in processing. Melissa evoked activation of cognitive-perceptual processes, contributed to attracting attention and generating an emotional response to a stimulus, facilitated information interactions and contributed to faster decision-making and selection of a motor program, activated the dorsolateral and prefrontal cortex and the inclusion of attention processes, working memory, in order to make a decision. Rosemary involved working memory (executive component), improved cortico-hippocampal interaction, and also improved oriented attention, which ensures the creation of images as a result of imagination, and carried out separate processing of imagery information at the decision stage.

Key words: coherence, EEG, aromats, nonverbal tasks, working memory.

Введение

Межполушарные отношения, возникающие в процессе выполнения вербальных и невербальных задач, могут влиять на эффективность и качество деятельности, а также на паттерны ЭЭГ. Индивидуальные особенности фоновых ритмов ЭЭГ отражают характер регуляторных процессов, обеспечивающих координацию внутрикорковых и корково-подкорковых взаимоотношений, общее состояние мозга. Однако существуют противоречивые данные о характере межполушарных отношений при решении невербальных задач.

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

Материалы и методы исследования

В исследовании принимали участие 38 практически здоровых обследуемых, в возрасте от 18 до 26 лет. В качестве модели деятельности использовали невербальные задачи. Каждый обследуемый должен был проанализировать 100 слайдов, исключая неподходящую по смыслу картинку на слайде в отсутствии и присутствии одорантов розмарина, мелиссы и лаванды. Запах предъявлялся открытым способом на расстоянии 2 см от кончика носа. Во время выполнения теста регистрировали ЭЭГ. Оцифрованная ЭЭГ экспортировалась в программную среду Python, где проводилась дальнейшая обработка сигналов. Спектральные характеристики

ЭЭГ анализировали в диапазоне дельта-, тета-, альфа-, бета1-, бета2- активности во всех исследуемых состояниях.

Результаты

Анализ пространственно-временных характеристик ЭЭГ показал, что при внесении в экспериментальную среду розмарина увеличивалась внутриполушарная когерентность (КОГ) в передних областях обоих полушарий в диапазоне тета- и дельта-активности, что можно трактовать как вовлечение управляющего компонента рабочей памяти [1], а также происходило увеличение межполушарной КОГ в лобных отведениях как для дельта-, так и для тета-активности, что связано с кортико-гиппокампальным взаимодействием, и принятием решения [2]. Решение невербальных задач в присутствии мелиссы сопровождалось увеличением межполушарной КОГ в лобных отведениях в диапазоне тета-активности, что может быть связано с активацией когнитивно-перцептивных процессов, привлечением внимания [3]. При действии лаванды в дельта-ритме образовывались треугольники внутриполушарных связей в левом полушарии в височно-теменно-центральных областях, что вероятно связано с возникновением диффузного дельта-ритма [4]. При тета-активности на фоне лаванды происходило увеличение внутриполушарной КОГ в лобно-височных отведениях обоих полушарий и межполушарной в лобных отведениях, что может отражать процессы переключения внимания [5, 6]. При альфа-активности наблюдали следующие изменения КОГ, на фоне розмарина появлялись связи в височно-теменно-затылочных отведениях и происходило ослабление межполушарной КОГ в височных отведениях, что может быть связано с процессами модуляции информационных потоков [7]. На фоне мелиссы снижалась КОГ в левом полушарии, образовывался треугольник в височно-теменно-центральных областях и височно-затылочной и лобно-височной связях, а также наблюдали повышение межполушарной КОГ в лобной отведениях и межполушарной КОГ в лобно-затылочных отведениях обоих полушарий, что говорит об облегчении информационного взаимодействия и более быстром принятии решения и выборе двигательной программы [8]. На фоне лаванды происходило значительное снижение КОГ в лобно-височных отведениях левого полушария и образовывался треугольник в височно-теменно-центральных отведениях также левого полушария, что может говорить о влиянии со стороны активирующих систем ствола мозга и подкорки [5]. В диапазоне бета1-активности наблюдали следующие изменения, на фоне розмарина и мелиссы была схожая картина, КОГ увеличивалась в височных межполушарных отведениях и КОГ снижалась в височных, теменных и затылочных отведениях левого полушария, это можно объяснить тем, что за наглядное представление предмета по названию отвечает левое полушарие в теменно-затылочных областях, а за обработку образной информации и извлечение ее из памяти отвечают оба полушария, а именно височная и теменная области. Уменьшение КОГ может говорить о независимой работе полушарий, а также на отдельную обработку образной информации на этапе решения. На фоне лаванды КОГ увеличивалась в лобных и центральных межполушарных связях, что может говорить о вовлечении левополушарных механизмов обработки информации в выполнении зрительно-моторного задания [8]. Снижение КОГ наблюдали в лобно-височных и височно-затылочных отведениях правого полушария, это может говорить об ослаблении взаимодействия во время запоминания информации. При бета2-активности на фоне розмарина повышалась КОГ в лобных межполушарных отведениях, а также снижалась в левом и правом полушарии, образуя треугольники в височно-теменно-центральных областях, а также снижалась КОГ в левом полушарии в лобно-височных отведениях, что может говорить о генерации бета-ритма в гиппокампе. На фоне мелиссы увеличивалась КОГ в лобно-височных областях правого полушария и в лобно-затылочных отведениях левого полушария, что может говорить об активации дорзолатеральной и префронтальной коры и включение процессов внимания, рабочей памяти, для того чтобы принять решение [9]. А также КОГ снижалась в

центральной межполушарной связи, височно-теменных областях левого полушария и височно-затылочных областях правого полушария. На фоне лаванды КОГ увеличивалась в лобных межполушарных отведениях и снижалась в височно-центральных и височно-теменных отведениях левого полушария и височно-затылочных правого полушария. Бета2-ритм имеет связь с отдельного компонента рабочей памяти, а именно связан с манипулированием и модально специфичной информацией [1].

Заключение

Таким образом, одоранты улучшали качество деятельности по сравнению с контролем, особенно при действии лаванды, которая активировала ствол мозга и подкорку, а также усиливала механизмы рабочей памяти. Мелисса вызывала активацию когнитивно-перцептивных процессов, способствовала привлечению внимания, облегчала информационное взаимодействия и способствовала более быстрому принятию решения и выбору двигательной программы, активировала дорсолатеральную и префронтальную кору и включение процессов внимания, рабочей памяти, для того чтобы принять решение. Розмарин активировал рабочую память (управляющий компонент), улучшал кортико-гиппокампальное взаимодействие, осуществлял отдельную обработку образной информации на этапе решения.

Список литературы

1. Розовская Р.И., Мачинская Р.И., Печенкова Е.В. Влияние эмоциональной окраски изображений на зрительную рабочую память у взрослых и подростков // Физиология человека. – 2016. – Т. 42, № 1. – С. 82–93.
2. Miller R. Cortico-hippocampal interplay and the representation of contexts in the brain. – Springer Science & Business Media, 2013. – V. 17.
3. Серов И.Е. и др. Прогнозирование вероятности запоминания логотипов неизвестных брендов по объективным электрофизиологическим показателям // Практический маркетинг. – 2019. – № 5 (267). – С. 3–10.
4. Яковенко И.А., Черемушкин Е.А. Сопоставление перестроек пространственно-временной организации потенциалов коры больших полушарий мозга человека с частотными характеристиками ЭЭГ при решении когнитивной задачи // Журн. высш. нерв. деят. – 1996. – Т. 46, № 3. – С. 469–478.
5. Дикая Л.А. Динамика функциональной организации коры головного мозга у испытуемых с разным уровнем креативности на этапах решения невербальной творческой задачи // Вестник Ленинградского государственного университета им. А.С. Пушкина. – 2010. – Т. 5, № 2. – С. 97–108.
6. Mellem M. S., Friedman R. B., Medvedev A. V. Gamma-and theta-band synchronization during semantic priming reflect local and long-range lexical–semantic networks // Brain and language. – 2013. – V. 127, № 3. – P. 440–451.
7. Başar E. et al. Alpha oscillations in brain functioning: an integrative theory // International journal of psychophysiology. – 1997. – V. 26, № 1–3. – С. 5–29.
8. Джебраилова Т.Д., Коробейникова И.И., Каратыгин Н.А. Когерентность потенциалов В1 диапазона 71 ЭЭГ и эффективность интеллектуальной деятельности человека // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – Т. 20, № 3. – С. 71–74.
9. Kerestes R. et al. Prefrontal cortical response to emotional faces in individuals with major depressive disorder in remission // Psychiatry Research: Neuroimaging. – 2012. – V. 202, № 1. – P. 30–37.

УДК 616-092.9:616-06

Особенности параметров ЭКГ у крыс при диет-индуцированном метаболическом синдроме на фоне адаптации к гипоксии

В.Р. Латонов, И.А. Деркачев

Научный руководитель: Б.К. Курбатов

Сибирский государственный медицинский университет

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

E-mail: latonovvr@mail.ru

Features of ECG parameters in rats with diet-induced metabolic syndrome against the background of adaptation to hypoxia

V.R. Latonov, I.A. Derkachev

Scientific Supervisor: B.K. Kurbatov

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow highway, 2, 634050

E-mail: latonovvr@mail.ru

Abstract. *In this study, we evaluate the features of ECG parameters after ischemia-reperfusion in rats with diet-induced metabolic syndrome against the background of adaptation to chronic normobaric hypoxia. Metabolic syndrome was caused by a high-carbohydrate, high-fat diet. Adaptation to chronic normobaric hypoxia involved placing rats in a sealed chamber with reduced partial pressure of oxygen. The study showed the difference between ECG parameters in rats with metabolic syndrome and adapted to chronic hypoxia from the corresponding parameters of rats with metabolic syndrome, not adapted to hypoxia, as well as healthy rats adapted to hypoxia. These differences may be associated with changes in the activation of ATP-dependent potassium channels during adaptation to hypoxia against the background of metabolic syndrome.*

Key words: *Chronic hypoxia adaptation, metabolic syndrome, ECG.*

Введение

Адаптация к хронической нормобарической гипоксии (ХНГ) выраженно повышает устойчивость сердца к повреждающему действию ишемии-реперфузии. Этот эффект во многом зависит от активации АТФ-зависимых калиевых каналов (K_{ATP}) [1] и снижается при развитии метаболического синдрома, что может быть вызвано снижением их активации [2, 3]. Однако данные, отражающие изменение электрофизиологических параметров сердца при сочетании метаболического синдрома и адаптации к ХНГ ограничены.

Целью данного исследования является определение особенностей параметров ЭКГ у крыс с метаболическим синдромом (МС) при адаптации к хронической нормобарической гипоксии после моделирования инфаркта.

Экспериментальная часть

Экспериментальные животные были разделены на 4 группы: контрольная группа, содержащаяся в условиях вивария на стандартной диете для лабораторных животных; группа крыс, адаптированных к хронической нормобарической гипоксии (ХНГ), содержащиеся на стандартной диете; группа, содержащаяся на высокоуглеводной высокожировой диете (ВУВЖД), (МС); группа крыс, адаптированных к ХНГ после моделирования МС (МС+ХНГ).

Хроническую нормобарическую гипоксию проводили путём помещения крыс в герметичную камеру, содержание кислорода в которой снижено до 12 % на 21 день. Парциальное давление O_2 и CO_2 внутри камеры поддерживалось системой «Био-нова-204G4R1» (НТО Био-нова, Россия) и контролировалось датчиками TCOD-IR и OLC 20 (Oldham, Франция) через блок управления MX 32 (Oldham, Франция). Животные извлекались из камеры за 24 часа до начала эксперимента.

Для моделирования МС крыс в течение 84 дней содержали на высокоуглеводной высокожировой диете с заменой питьевой воды на 20 % раствор фруктозы. Состав корма: белки 16 %, жиры 21 %, углеводы 46 % (в том числе 17 % фруктоза), 0,125 % холестерин, 0,5 % холевая кислота. После окончания ВУВЖД животных в течение 1 недели содержали на стандартной диете.

Для моделирования инфаркта миокарда крыс наркотизировали хлоралозой (60 мг/кг внутрибрюшинно) и подключали к аппарату искусственной вентиляции легких SAR-830 Series Small Animal Ventilator (CWE, inc., США). Правую сонную артерию канюлировали для измерения артериального давления, которое регистрировали с помощью датчика SS13L (Biopac System inc., США), подключенного к аппарату для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System inc., США). Этот же аппарат использовался для записи электрокардиограммы. Выполняли левостороннюю торакотомию, на левую нисходящую коронарную артерию накладывали лигатуру. После 45 минут ишемии лигатуру ослабляли. Продолжительность реперфузии составляла 45 минут.

Измерение параметров ЭКГ проводилось через 45 минут после реперфузии. Измеренные параметры ЭКГ: Частота сердечных сокращений (ЧСС), длина комплекса QRS, скорректированное значение длины интервала QT (QTc), высота зубца R, отношение высоты поднятия сегмента ST к высоте зубца R (ST/R)

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 12.0. Сравнение групп проводили с применением критерия Крускала-Уоллиса, с последующим применением апостериорного критерия Данна. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде Медианы (Квартиль1; Квартиль3), Me (Q1; Q3).

Результаты

После моделирования инфаркта миокарда крысы группы ХНГ демонстрировали увеличенную длительность комплекса QRS на 5 % ($p = 0,032$) и скорректированного QT интервала на 17 % ($p = 0,009$) относительно крыс контрольной группы. У крыс, входящих в группу МС наблюдалось снижение ЧСС на 7 % ($p = 0,016$) (табл. 1).

Таблица 1

Изменение параметров ЭКГ у крыс при МС и адаптации к ХНГ

Параметр	Группа			
	Контроль	МС	ХНГ	МС+ХНГ
ЧСС, мин ⁻¹	379,8 (367,1;388,4)	354,0 (327,3;370,4)*	375,0 (333,3;400,0)	283,9 (233,5;314,1)*
QRS, мс	105,0 (101,5;108,5)	110,0 (104,0;114,0)	110,0 (109,0;121,7)*	138,3 (114,0;179,0)*
QTc, мс	127,7 (125,2;128,8)	129,6 (120,4;133,1)	136,1 (133,5;141,1)*	149,0 (138,7;168,8)*
R, мВ	0,28 (0,25;0,33)	0,28 (0,24;0,29)	0,26 (0,20;0,35)	0,56 (0,35;0,76)*
ST/R, %	7,35 (3,51;11,10)	9,96 (8,14;10,92)	5,58 (4,09;6,78)	5,41 (4,07;7,78)

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

Измеренные после моделирования инфаркта параметры ЭКГ у крыс с метаболическим синдромом, адаптированных к ХНГ, отличались от соответствующих параметров в других группах: у крыс, входящих в группу МС+ХНГ выявлено увеличение продолжительности QTc относительно крыс группы МС (на 15,5 % $p = 0,0247$) и относительно контрольной группы (на 17 %, $p = 0,0051$). Также в группе лабораторных животных с МС, адаптированных к ХНГ наблюдалось увеличение амплитуды зубца R относительно крыс контрольной группы (в 2 раза, $p = 0,0088$) (рис. 1) а также существенное снижение ЧСС относительно остальных групп.

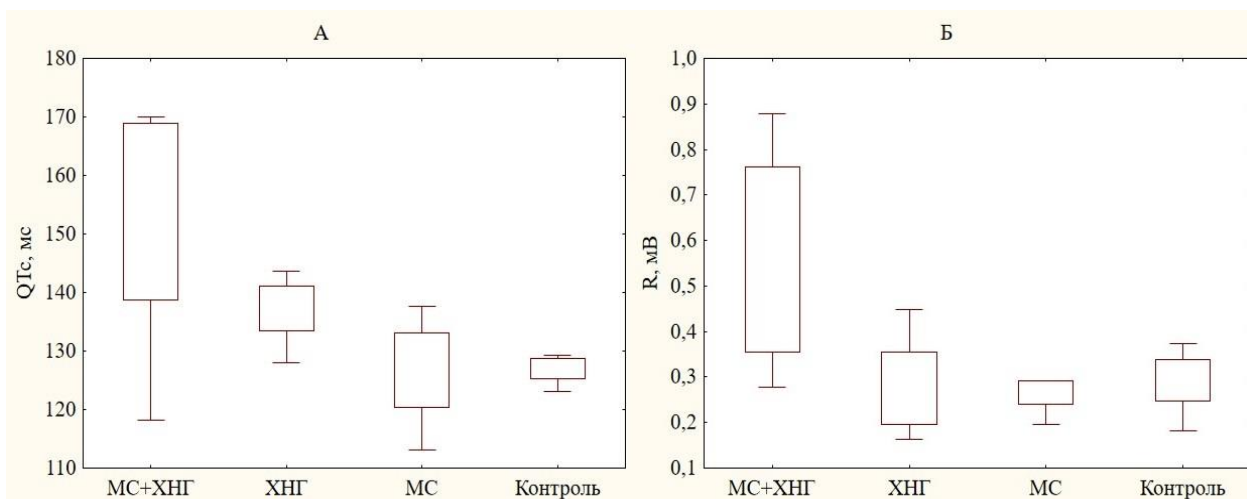


Рис. 1. Диаграммы распределения значений параметра QT_c (А) и амплитуды зубца R (Б) в экспериментальных группах

Заключение

Представленные изменения параметров ЭКГ могут свидетельствовать об изменениях в структуре потенциала действия в кардиомиоцитах крыс, вызванных сдвигом в активации АТФ-зависимых калиевых каналов вследствие метаболических нарушений [3, 4], происходящих в клетках крыс с диет-индуцированным метаболическим синдромом на фоне адаптации к хронической нормобарической гипоксии. Можно предположить, что активация K_{ATP} при сочетанном действии адаптации к ХНГ [5] и диет-индуцированного метаболического синдрома [3] снижает возможности для их дальнейшей активации во время ишемии-реперфузии, что обуславливает особенности электрофизиологии, описанные в данном исследовании.

Исследование выполнено при поддержке РНФ (Грант № 22-15-00048).

Список литературы

1. Naryzhnaya N.V., Maslov L.N., Derkachev I.A., Ma H., Zhang Y., Prasad N.R., Singh N., Fu F., Pei J., Sarybaev A., Sydykov A. The effect of an adaptation to hypoxia on cardiac tolerance to ischemia/reperfusion // *Journal of Biomedical Research*. – 2023. – V. 37, № 4. – P. 230–254.
2. Деркачев И.А. Формирование кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной гипоксии у крыс при индуцированном метаболическом синдроме // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2022. – Т. 7, № 5–1. – С. 188–194.
3. Csonka C., Kupai K., Bencsik P., Görbe A., Pálóczi J., Zvara A., Puskás L.G., Csont T., Ferdinandy P. Cholesterol-enriched diet inhibits cardioprotection by ATP-sensitive K^+ channel activators cromakalim and diazoxide // *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. – 2014. – Vol. 306, № 3. – P. H405–413.
4. Kane G.C., Liu X.-K., Yamada S., Olson T.M., Terzic A. Сердечные K^+ -АТФ-каналы в норме и при заболеваниях // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2005. – Т. 38, № 6. – С. 937–943.
5. Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Деркачев И.А., Fu F. О значимости NO-синтазы, активных форм кислорода, киназ и Катф-каналов в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к гипоксии // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. – 2022. – V. 108, № 4. – P. 414–429.

УДК 616.995.122

Профиль микроРНК внеклеточных везикул трематоды *Opisthorchis felineus*Е.А. Лишай^{1,2}, Е.В. Медведева^{1,2}Научный руководитель: д.б.н. М.Ю. Пахарукова^{1,2}¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,
Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, 630090²Новосибирский государственный университет,

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

E-mail: lishai.ekaterina@gmail.ru**MicroRNA profile of extracellular vesicles of the trematode *Opisthorchis felineus***E.A. Lishai^{1,2}, E.V. Medvedeva^{1,2}Scientific Supervisor: Dr., M.Yu. Pakharukova^{1,2}¹Institute of Cytology and Genetics, Russia, Novosibirsk, Akademika Lavrentieva str., 10, 630090²Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogova st., 1, 630090E-mail: lishai.ekaterina@gmail.ru

Abstract. *Opisthorchis felineus* is a trematode of the Opisthorchiidae family that parasitizes the bile ducts of mammals, including humans. Prolonged infection leads to the development of chronic inflammation and bile duct neoplasia. The trematodes influence host cells using biologically active compounds, such as microRNAs, which they secrete as part of extracellular vesicles. Thus, by studying the microRNA profile of exosomes, it is possible to determine the cellular pathways through which parasites influence host cells. Using small RNA sequencing approach, we showed that the abundance of individual miRNAs in extracellular vesicles was different from that in the whole worm lysate. Major miRNAs in exosomes were identified, and their structure was evaluated. Target genes for major miRNAs were predicted using the human genome. Functional enrichment analysis of target genes showed enrichment in the epithelial-mesenchymal transition pathway for Ofe-Mir-277-P2 and the proteoglycan pathway in carcinogenesis for Ofe-Mir-10-P1.

Key words: microRNA, *Opisthorchis felineus*, exosomes.

Введение

Opisthorchis felineus является эпидемиологически значимой трематодой семейства Opisthorchiidae, широко распространенной в бассейнах рек Обь и Иртыш и паразитирующей в желчных протоках рыбоядных млекопитающих, в том числе и человека. Длительное заражение приводит к воспалению желчных протоков, изменению их эпителия, а также раку желчных протоков - холангиокарциноме [1].

Трематоды могут воздействовать на клетки хозяина, выделяя внеклеточные везикулы, которые в своем составе содержат различные биологически активные соединения, в частности микроРНК. МикроРНК – это класс консервативных малых некодирующих РНК длиной от 18 до 25 нуклеотидов, которые участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. Высоко специфичное связывание специального участка микроРНК (со второго по седьмой нуклеотид) – “seed-региона” – с 3’ нетранслируемым регионом целевой мРНК может индуцировать полную деградацию мРНК [2]. Ранее было показано, что микроРНК необходимы не только для развития самого паразита внутри хозяина, но и для регуляции взаимодействий между паразитом и хозяином [3, 4]. В настоящее время для многих видов трематод, в частности для *O. felineus*, не известен даже состав микроРНК в экзосомах, выделяемых паразитами.

Таким образом, целью работы является исследование профиля микроРНК внеклеточных везикул *O. felineus*.

Экспериментальная часть

Малые РНК были выделены из внеклеточных везикул *O. felinus* с помощью miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen), после чего получали кДНК-библиотеки, используя набор MGIEasy Small RNA Library Prep Kit V2.0. После приготовления библиотек они были проанализированы с помощью Agilent (Agilent RNA 6000 pico). Секвенирование проводили на платформе DNBSEQ 1X50 п.н. (BGI, Китай) с использованием технологии BGISEQ-500.

Качество полученных библиотек после секвенирования контролировали с помощью программы FastQC. Картирование библиотек на референсный геном *O. felinus* проводили с использованием алгоритма bowtie2. Для идентификации известных микроРНК *O. felinus* использовали алгоритм miRDeep2. Список известных микроРНК трематоды и их предшественников составляли по данным статьи [5]. Исследование консервативности мажорных микроРНК проводили с помощью базы данных miRBase. Для поиска генов-мишеней использовали комбинацию программ TargetScan и miRDB. Анализ функционального обогащения генов-мишеней проводили с использованием базы данных KEGG и MsigDB.

Результаты

После секвенирования трех библиотек малых РНК из экзосом было получено в среднем 3312936 прочтений на библиотеку.

По опубликованным данным взрослые трематоды имеют 56 пре-микроРНК и 109 зрелых микроРНК. В составе экзосом было обнаружено 97 зрелых микроРНК. Наиболее представленными были такие микроРНК, как Ofe-Mir-277-P2_3p (относительная представленность в образцах 18,52 %), Ofe-Mir-71-P1_5p (17,69 %), Ofe-Bantam_3p (11,82 %), Ofe-Mir-10-P1_5p (11,33 %), Ofe-Mir-219_5p (6,01 %), Ofe-Mir-7-P1_5p (3,45 %). Были выявлены различия в относительном содержании микроРНК в экзосомах по сравнению с взрослыми особями (Рис. 1). Так, наиболее представленной микроРНК во взрослых особях является Ofe-Mir-10-P2a (48 %), тогда как в экзосомах содержание этой микроРНК составляет 4,41 %. Напротив, наиболее представленная микроРНК в экзосомах - Ofe-Mir-277-P2_3p - во взрослых червях составляет менее 0,02 %. Это может свидетельствовать о том, что некоторые микроРНК выделяются именно в составе экзосом, а не, например, с микровезикулами, которые содержат цитоплазму и, соответственно, содержание микроРНК как в цитоплазме.

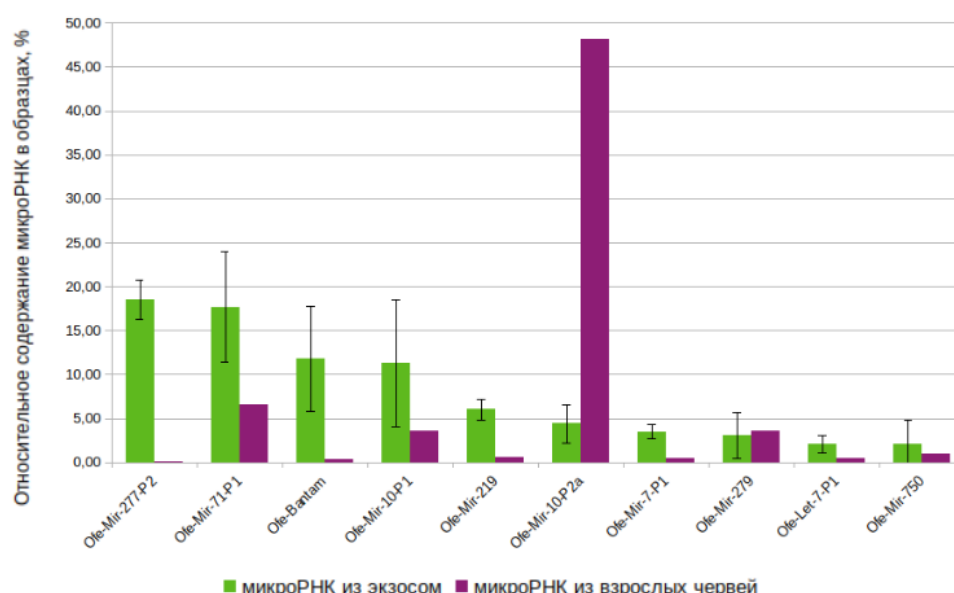


Рис. 1. Относительное содержание мажорных микроРНК в экзосомах и во взрослых червях

Для мажорных микроРНК из экзосом *O. felineus* была исследована консервативность (Рис. 2). Показано, что Ofe-Bantam-3p представлена у Platyhelminthes и Nematoda, тогда как у Arthropoda уже есть замены в seed-регионе (то есть связывающемся с мРНК). Это может объясняться различием функций микроРНК Bantam у червей и насекомых. Ofe-Mir-10-P1 и Ofe-Mir-10-P2a являются высоко консервативными, представлены в том числе и у человека с идентичным seed-регионом. Это позволяет предположить, что микроРНК *O. felineus* могут действовать на те же гены-мишени, что и их человеческие гомологи.

	Protostomia			Deuterostomia			
	Platyhelminthes	Nematoda	Arthropoda	Echinodermata	Pisces	Aves	Mammalia
Ofe-Mir-277-P2	+	+	+				
Ofe-Mir-71-P1	+	+	+	+			
Ofe-Bantam	+	+					
Ofe-Mir-10-P1	+	+	+	+	+	+	+
Ofe-Mir-10-P2a	+	+	+	+	+	+	+

Рис. 2. Консервативность мажорных микроРНК *O. felineus*

Были предсказаны гены мишени в геноме человека для Ofe-Mir-277-P2, среди которых наблюдалось обогащение по генам эпителиально-мезенхимального перехода (p-value = 0.00063), секреции белков (p-value = 0.01642), миогенеза (p-value = 0.04623), PI3K-Akt сигнального пути (p-value = 0.04118) и регуляции актинового цитоскелета (p-value = 0.04118). Для Ofe-Mir-10-P1 обогащение среди генов мишеней человека наблюдали по пути, связанном с протеогликанами при канцерогенезе (p-value = 0.00374).

Заключение

Изучение паразитарных микроРНК, входящих в состав экзосом, и определение их мишеней в клетках хозяина дает возможность определить вклад этих молекул в механизм взаимодействия между паразитом и хозяином, в том числе и в развитие холангиокарциномы. Эти результаты подчеркивают важность дальнейших исследований роли внеклеточных везикул паразитического происхождения и их микроРНК в патогенезе паразитарных заболеваний.

Работа поддержана грантом РФФ №24-44-00048.

Список литературы

1. Xia J., Jiang S.C., Peng H.J. Association between Liver Fluke Infection and Hepatobiliary Pathological Changes: A Systematic Review and Meta-Analysis // PloS one. – 2015. – № 10 (7).
2. Ricafrente A., Cwiklinski K., Nguyen H., et al. Stage-specific miRNAs regulate gene expression associated with growth, development and parasite-host interaction during the intra-mammalian migration of the zoonotic helminth parasite *Fasciola hepatica* // BMC genomics. – 2022. – №23 (1).
3. Meningher T., Barsheshet Y., Ofir-Birin Y., Gold D., Brant B., Dekel E., Sidi Y., Schwartz E., Regev-Rudski N., Avni O., et al. Schistosomal extracellular vesicle-enclosed miRNAs modulate host T helper cell differentiation // EMBO Rep. – 2020. – № 21.
4. Tran N., Ricafrente A., To J., Lund M., et al. *Fasciola hepatica* hijacks host macrophage miRNA machinery to modulate early innate immune responses // Sci Rep. – 2021. – № 11.
5. Ovchinnikov V.Y., Mordvinov V.A., Fromm B. Extreme conservation of miRNA complements in opisthorchiids // Parasitology International. – 2017. – № 66. – P. 773–776.

УДК 575.224.4:575.224.4:577.218

**Уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 коррелирует в ворсинах
хориона спонтанных абортусов из одних и тех же семей**

И.В. Лушников, В.В. Деменева

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

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

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

E-mail: ladrek13@mail.ru

**Retrotransposon LINE-1 methylation correlates in chorionic villi of spontaneous
abortions from same families**

I.V. Lushnikov, V.V. Demeneva

Scientific Supervisor: Dr., S.A. Vasilyev

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian
Academy of Sciences Tomsk, Russia, Ushayka River Embankment str., 10, 634050

E-mail: ladrek13@mail.ru

Abstract. *Currently, a high rate of pregnancy loss remains a significant issue, with one of the contributing factors being disruptions in epigenetic gene regulation. The aim of this study was to analyze the correlation of LINE-1 retrotransposon methylation levels in chorionic tissue from pairs of spontaneous abortion within the same families. A sample comprising 21 pairs of spontaneous abortions was collected, and the methylation levels of the LINE-1 retrotransposon were analyzed using targeted bisulfite massive parallel sequencing. It was found that the methylation level of the LINE-1 retrotransposon significantly correlates among spontaneous abortions from the same families. The identified patterns suggest possible inheritance of LINE-1 methylation levels from one of the parents or the influence of various factors on LINE-1 methylation levels during pregnancy.*

Key words: LINE-1 retrotransposon, DNA methylation, pregnancy loss.

Введение

Невынашивание беременности в настоящее время остается распространенным явлением, затрагивающим более 15 % всех беременностей [1]. Известно много причин невынашивания беременности, в том числе хромосомные перестройки и анеуплоидия. Однако значительная часть спонтанных абортусов не может быть объяснена вышеуказанными причинами [2]. Известно, что значительную роль в успешном развитии эмбриона играет развитие плаценты, которое обусловлено в том числе эпигенетической регуляцией активности генов [3]. Одним из сигналов о нарушениях эпигенетической регуляции может являться высокий уровень метилирования мобильного элемента LINE-1, занимающего около 20 % генома. Ранее нами были выявлены нарушения уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона у спонтанных абортусов первого триместра беременности [4]. В данной работе был проведен анализ корреляции уровней метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона пар спонтанных абортусов из одних и тех же семей.

Экспериментальная часть

Была сформирована выборка из 21 пары спонтанных абортусов первого триместра беременности из одних и тех же семей. Для всех спонтанных абортусов было проведено кариотипирование с помощью молекулярных методов, включая хромосомный микроматричный анализ. Учитывая возможное ложное отцовство, дополнительно для всех спонтанных абортусов был проведен анализ родства с помощью панели COrDIS ЭКСПЕРТ

26 (Гордиз, Россия). В данной панели присутствуют STR-маркеры для всех хромосом, кроме 9, 14, 15, 17, и 20. Половые хромосомы определялись по пяти локусам: Amel X – Xp22.1-22.3; Amel Y – Yp11.2; SRY – Yp11.2; DYS391 – Y; Yindel – Yq11.221. Материалом для исследования послужила ДНК, выделенная из хориона спонтанных абортусов ($n = 40$), эндометрия матери спонтанных абортусов ($n=4$) и ДНК из лимфоцитов периферической крови родителей спонтанных абортусов (13 женщин и 9 мужчин). Всего проанализировано 9 полных семей, где был доступен материал обоих родителей и спонтанных абортусов, 8 семей, где был доступен только материал матери и спонтанных абортусов, 4 семьи, для которых не было материала родителей в наличии.

Для всех спонтанных абортусов из сформированной группы был проведен анализ уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования [5]. В качестве группы сравнения использовались неродственные спонтанные абортусы, для которых также был проведен анализ уровня метилирования LINE-1 [6]. Анализовалась корреляция между уровнями метилирования ретротранспозона LINE-1 у спонтанных абортусов из одних и тех же семей.

Результаты

В результате анализа родства обнаружено, что 16 пар спонтанных абортусов являлись полными сибсами, 4 пары – полусибсами с общими матерями, 1 пара – полусибсами с общим отцом.

Было обнаружено, что уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 значимо коррелирует у спонтанных абортусов из одних и тех же семей ($n = 21$ пара, $R = 0,71$, $p = 0,0003$). Для пар спонтанных абортусов с нормальным кариотипом ($n = 10$) корреляция остается значимой ($R = 0,74$, $p = 0,015$), тогда как для пар спонтанных абортусов, в которых один из абортусов имеет анеуплоидию, корреляция становится статистически незначимой ($n = 8$, $R = 0,64$, $p = 0,08$). Если исключить из всего анализа без учета кариотипа спонтанных абортусов полусибсов ($n = 5$), то корреляция также остается значимой ($n = 16$ пар, $R = 0,67$, $p = 0,005$). При этом значимых отличий между уровнем метилирования у всех первых абортусов и всех последующих абортусов в парах не было обнаружено ($47,9 \pm 6,9$ % против $43,9 \pm 6,8$ %, $p = 0,062$). В качестве выборки неродственных абортусов использовалась выборка спонтанных абортусов с нормальным кариотипом ($n = 173$) и неродственных медицинских абортусов ($n = 39$), для которых был проанализирован уровень метилирования LINE-1[5]. Значимых корреляций обнаружено не было (рис. 1).

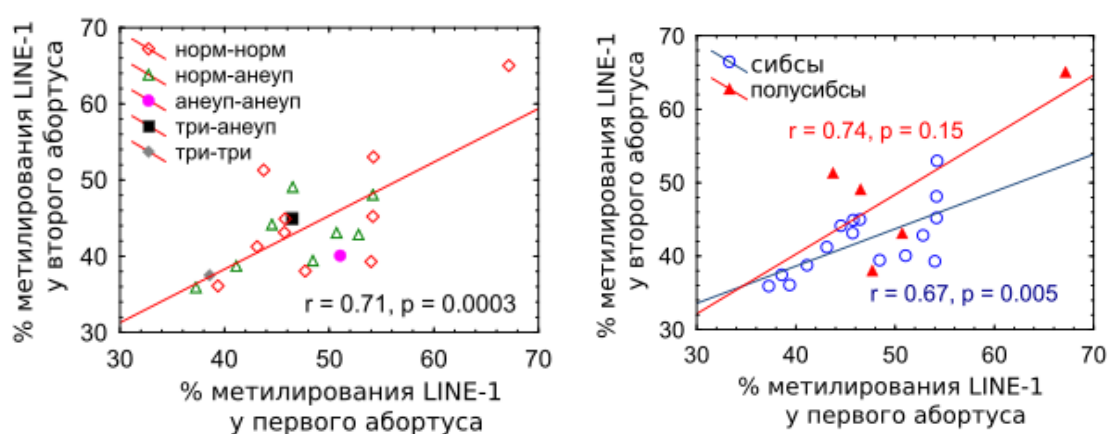


Рис. 1. Корреляция уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов с различным кариотипом из одних и тех же семей. В качестве первого абортуса взят хронологически более ранний абортус, в качестве второго – более поздний. Анализ проведен с помощью коэффициента корреляции Пирсона. А. Корреляция уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона для всех образцов ($n = 21$ пара) с выделением пар образцов с различным кариотипом (норм-норм – оба спонтанных абортуса с нормальным кариотипом, норм-анеуп – один из спонтанных

абортусов с нормальным кариотипом, другой с анеуплоидией, анеуп-анеуп – оба спонтанных абортусов с анеуплоидией, три-анеуп – один из спонтанных абортусов с триплоидией, другой с анеуплоидией, три-три – оба спонтанных абортусов с триплоидией). **Б.** Корреляция уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона для подгрупп спонтанных абортусов, являющихся друг другу полными сибсами (голубые круги) ($n = 16$) или полусибсами (красные треугольники) ($n = 5$).

Кроме того, корреляционный анализ уровня метилирования у спонтанных абортусов был проведен для всех возможных перестановок между первым и вторым спонтанными абортусами в семье. В результате во всех случаях корреляция оказывалась значимой ($R = 0,66 \pm 0,04$, $p = 0,001 \pm 0,0011$).

Заключение

Обнаруженная корреляция между уровнями метилирования ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов из одних и тех же семей может быть косвенным свидетельством влияния на уровень метилирования LINE-1 как минимум одного из родителей. В частности, это может быть связано с нарушениями уровня метилирования LINE-1 в примордиальных клетках, являющихся предковыми по отношению к гаметам, участвовавшим в формировании исследуемых эмбрионов. Кроме того, это может также указывать на влияние на уровень метилирования LINE-1 различных факторов, действующих во время беременности.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 23-15-00341.

Список литературы

1. Quenby S., Gallos I.D., Dhillon-Smith R.K., et al. Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss // Lancet – 2021. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33915094/> (дата обращения: 28.02.2024).
2. Li T.C., Makris M., Tomsu M., Tuckerman E., Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis // Hum Reprod Update – 2002. – Vol. 8. – URL: <https://doi.org/10.1093/humupd/8.5.463> (дата обращения: 28.02.2024).
3. Shridhar V., Chu T., Simhan H., Shaw P.A., Peters D.G. High-resolution analysis of the human placental DNA methylome in early gestation // Prenat Diagn – 2020. – Vol. 4. – URL: <https://doi.org/10.1002/pd.5618> (дата обращения: 28.02.2024).
4. Vasilyev S.A., Tolmacheva E.N., Vasilyeva O.Y., Markov A.V., Zhigalina D.I., Zatula L.A., Lee V.A., Serdyukova E.S., Sazhenova E.A., Nikitina T.V., Kashevarova A.A., Lebedev I.N. LINE-1 retrotransposon methylation in chorionic villi of first trimester miscarriages with aneuploidy // J Assist Reprod Genet – 2021. – Vol. 1. – URL: <https://doi.org/10.1007/s10815-020-02003-1> (дата обращения: 28.02.2024).
5. Vasilyev S.A., Markov A.V., Vasilyeva O.Yu., Tolmacheva E.N., Zatula L.A., Sharysh D.V., Zhigalina D.I., Demeneva V.V., Lebedev I.N. Method of targeted bisulfite massive parallel sequencing of the human LINE-1 retrotransposon promoter // MethodsX. – 2021. – Vol. 8. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34434857/> (дата обращения: 28.02.2024).
6. Васильев С.А., Деменева В.В., Толмачева Е.Н., Филатова С.А., Зуев А.С., Ушакова А.С., Васильева О.Ю., Лушников И.В., Саженова Е.А., Никитина Т.В., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н. Уровень метилирования подсемейств ретротранспозона LINE-1 в ворсинах хориона при невынашивании беременности // Генетика. – 2023. – Т. 59, № 12. – С. 1419–1426.

УДК 616-00:575.113:98/99

**Полиморфизм rs7044343 гена IL33 как прогностический маркер развития
бронхолегочных и онкологических заболеваний в популяциях Арктики**И.В. Марченко

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

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное
подразделение Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук»,
Россия, г. Красноярск, Партизана Железняка, 3г, 660022

Email: sonesoundfordj@mail.ru**Polymorphism rs7044343 of the IL33 gene as a prognostic marker for the development
of bronchopulmonary and oncological diseases in Arctic populations**I.V. Marchenko

Scientific Supervisor: Ph.D., M.V. Smolnikova

Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Russia, Krasnoyarsk, Partizana
Zheleznyaka, 3g, 660022

Email: sonesoundfordj@mail.ru

Abstract. The priority direction of the development of the Arctic zone of the Russian Federation is the health care of its population. The life expectancy of the peoples of the Arctic has been reduced due to extreme environmental conditions and exposure to organic pollutants. Studies show that the most common diseases in this region are allergies and bronchopulmonary diseases, and oncological diseases. Cells of the immune system, including interleukin IL-33, play an important role in the development of inflammatory diseases and oncology. The polymorphism of rs7044343 IL33 leads to different levels of protein production, which, in turn, affects the course of inflammatory processes and carcinogenesis processes. A study of the distribution of genotypes of the rs7044343 polymorphism of the IL33 gene in Nenets and Dolgan-Nganasan showed the predominance of the CC genotype associated with an increased concentration of protein in the blood, which may contribute to the faster development of inflammatory processes.

Key words: oncology, immunity, Arctic, polymorphism

Введение

Здоровье населения Арктики – один из ключевых аспектов, определяющих качество развития региона. Ввиду воздействия экстремальных условий окружающей среды, продолжительность жизни народов Арктики гораздо меньше, чем в других народах мира. Так, например, жители инуитского Нунагата (Канада) живут на 11 лет меньше, чем другие канадцы [1]. Помимо дискомфортных факторов среды на организм человека оказывают стойкие органические загрязнители (например, промышленные химикаты, пестициды) и металлы [2]. Совокупность этих факторов приводит к повышенному риску развития воспалительных заболеваний, обусловленных работой иммунной системы, в частности развитию аллергии и бронхолегочных болезней, таких как, бронхиальная астма, хроническая обструкция легких (ХОБЛ), пневмония [3, 4]. В своих исследованиях, ученые из Дании отметили, что аллергические заболевания являются распространенными хроническими заболеваниями у детей и подростков северных регионов [5].

Согласно результатам исследований Института циркумполярных исследований здоровья, подавляющее большинство смертей населения в Арктической зоне происходит из-за онкологических заболеваний. По оценкам исследователей, на их развитие влияют климатические условия, а также образ жизни людей, включающий такие факторы как злоупотребление алкоголем, изменение диеты, ожирение и т.д. [6].

Однако помимо факторов среды значительную роль в возникновении заболевания играют клетки иммунной системы (ИС). Одним из ключевых участников ИС является интерлейкин IL-33. IL-33 продуцируется Th2 клетками участвует во врожденном и приобретенном иммунитете [7]. Он экспрессируется в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, как следствие, встречается практически во всех органах и тканях человека. Воспалительные процессы в организме человека сопровождаются увеличением продукции IL-33 в крови. При этом его чрезмерная активация провоцирует обострение воспалительных заболеваний дыхательных путей [8]. Отмечено, что у людей с хронической обструктивной болезнью легких повышена экспрессия IL33 в базальных клетках бронхов и легких. Таким образом избыток белка IL-33 провоцирует обострение воспалительных заболеваний дыхательных путей, а также обуславливает фиброзные изменения в легких [9].

IL-33 рассматривается как потенциальный биомаркер онкологических патологий, позволяющий не только выявить наличие опухоли, но и спрогнозировать прогрессирование заболевания. Результаты большинства исследований указывают на ассоциацию повышенной экспрессии IL-33 с ухудшением выживаемости онкобольных. Например, высокий уровень IL-33 в сыворотке крови и опухолевой ткани является основанием для плохого прогноза при глиомах, раке желудка [8]. Показано, что IL-33 регулирует гибель опухолевых клеток с низким метастатическим потенциалом, тем самым способствуя росту клеток с высокой степенью метастазирования при раке легких [10]. Однонуклеотидный полиморфизм rs7044343 является функциональным и влияет на экспрессию гена IL33.

Таким образом, целью работы являлось изучение распределения полиморфизма rs7044343 гена IL33 в популяциях ненцев, долган-нганасан и славян.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлась ДНК, выделенная из сухих пятен крови новорожденных Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края. Дети Арктических популяций были расформированы по группам в зависимости от этнической принадлежности: ненцы ($n = 171$) и долгане-нганасаны ($n = 112$). Группу контроля составили новорождённые г. Красноярска ($n = 171$). Генотипирование однонуклеотидного полиморфизма rs7044343 гена IL33 осуществлялось методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием специфических олигонуклеотидных зондов TaqMan (ООО «ДНК-синтез», Россия). Для сравнения частоты аллелей и генотипов между группами использовался онлайн-калькулятор (<https://medstatistic.ru/>). Проверка соответствия частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга осуществлялась с применением статистического критерия χ^2 . Исследование было одобрено Этическим комитетом НИИ медицинских проблем Севера (№ 9 от 8.09.2014). От родителей или законных представителей всех участников было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Результаты

В ходе проведенного исследования было показано, что гомозиготный генотип по вариантному аллелю Т полиморфизма rs7044343 IL33 наиболее часто встречается у славян по сравнению с ненцами и долган-нганасанами (таблица 1).

Таблица 1

Частота генотипов и аллельных вариантов rs7044343 IL33 в исследованных популяциях

Генотип/аллель	Ненцы $n = 171$	Долгане-Нганасаны $n = 112$	Славяне $n = 171$	p	χ^2
rs7044343 (IL33)					
СС	33,3 (57)	21,4 (24)	11,1 (19)	1,3<0,001 2,3=0,02	1,3=32,58 2,3=8,12
СТ	52,6 (90)	57,2 (64)	55,6 (95)		
ТТ	14,1 (24)	21,4 (24)	33,3 (57)		
С	59,6 (204)	50,0 (112)	38,9 (133)	1,3<0,001 2,3=0,009	1,3=29,49 2,3=6,81
Т*	40,4 (138)	50,0 (112)	61,1 (209)		

Знаком «*» обозначен редкий аллель. Показаны результаты только с $p < 0,05$.

Проведенные исследования показывают, что носители аллеля T имеют пониженные уровни белка IL-33 в крови, в то время как, генотип CC ассоциирован с повышенной концентрацией белка в крови, что может оказывать влияние на скорость развития воспалительных процессов [7, 8, 11]. Среди ненцев и долган-нганасан частота встречаемости генотипа CC выше (33,3 % и 21,4 %, $p < 0,05$) по сравнению со славянами (11,1 %).

Таким образом, мы можем предположить, что коренные народы Арктики обладают повышенным уровнем IL-33 в крови, что может способствовать более частому возникновению бронхолегочных заболеваний. Ввиду положительного влияния IL-33 на рост раковых клеток, повышенное содержание данного цитокина может способствовать активации процесса канцерогенеза.

Список литературы.

1. Friberg J.T., Melbye M. Cancer patterns in Inuit populations // *The Lancet. Oncology*. – 2008. – Vol. 9, № 9. – P. 892–900.
2. Carrillo-Vico A., Lardone P.J., Alvarez-Sánchez N., Rodríguez-Rodríguez A., Guerrero J.M. Mela-tonin: buffering the immune system // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2013. – Vol. 14, № 4. – P. 8638–8683.
3. Arctic Monitoring and Assessment Programme. AMAP and the Arctic Council // сайт. – 2024. – URL: <https://www.amap.no/>
4. Никанов А.Н., Дорофеев В.М., Талыкова Л.В., Стурлис Н.В., Гущин И.В. Заболеваемость взрослого населения европейской Арктики Российской Федерации с развитой горно-металлургической промышленностью // *Российская Арктика*. – 2019. – № 6. – С. 20–27.
5. Andersson A.M., Halling A.S., Loft N., Skov L., Koch A., Guttman-Yassky E., Thyssen J.P. Atopic dermatitis among children and adolescents in the Arctic region - a systematic review and meta-analysis // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. – 2021. – Vol. 35, № 8. – P. 1642–1654.
6. Driscoll D.L., Dotterer B., Brown R.A. Assessing the social and physical determinants of circumpolar population health // *International journal of circumpolar health*. – 2013. – Vol. 72, № 1. – P. 21400.
7. Liew F., Girard J.P., Turnquist H. Interleukin-33 in health and disease // *Nature Reviews Immunology*. – 2016. – Vol. 16. – P. 676–689.
8. Горбачова А.М., Митькин Н.А. Интерлейкин-33: друг или враг в борьбе против опухоли? // *Молекулярная биология*. – 2019. – №57 (5). – С.774–789.
9. McKenzie A.N.J., Spits H., Eberl G. Innate lymphoid cells in inflammation and immunity // *Immunity*. – 2014. – Vol. 41. – P. 366–374.
10. Wang C., Chen Z., Bu X., Han Y., Shan S., Ren T., Song W. IL-33 signaling fuels outgrowth and metastasis of human lung cancer // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2016. – Vol. 479. – P. 461–468.
11. Falahi S., Mortazavi S.H.R., Salari F., Koohyanizadeh F., Rezaeimanesh A., Gorgin K.A. Association between IL-33 Gene Polymorphism (Rs7044343) and Risk of Allergic Rhinitis // *Immunological Investigations*. – 2022. – Vol. 51, № 1. – P. 29–39.

УДК: 616.895.8: 616-06

**Полиморфный вариант rs1800566 гена NQO1: ассоциации с компонентами
метаболического синдрома у больных шизофренией**

И.А. Меднова, И.В. Пожидаев, Е.В. Михалицкая

Научный руководитель: профессор, д.м.н., С.А. Иванова

Научно-исследовательский институт психического здоровья Томский
национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук

Россия, г. Томск, ул. Алеутская, 4, 634027

E-mail: i.mednova@yandex.ru

**Polymorphic variant rs1800566 of the NQO1 gene: associations with metabolic
syndrome components in patients with schizophrenia**

I.A. Mednova, I.V. Pozhidaev, E.V. Mikhalkitskaya

Scientific Supervisor: Prof., Dr., S.A. Ivanova

Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the
Russian Academy of Sciences, Russia, Tomsk, Aleutskaya str., 4, 634027

E-mail: i.mednova@yandex.ru

Abstract. *This study is aimed at studying the role of rs1800566 polymorphic variant of the NQO1 gene in the pathogenesis of metabolic syndrome in patients with schizophrenia. The study involved 453 patients with schizophrenia from the Siberian region who had been taking antipsychotic therapy for a long time. Associations of the studied polymorphism with hypertriglyceridemia were found: T allele was predisposing (OR: 1.53; 95 % CI: 1.08–2.16), and the C allele was protective (OR: 0.65; 95 % CI: 0.46–0.92) effect. Bioinformatics tools showed that the alternative allele was associated with decreased NQO1 expression.*

Key words: *schizophrenia, metabolic syndrome, NQO1.*

Введение

Метаболический синдром (МС) широко распространен среди больных шизофренией и считается фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета 2 типа и преждевременной смертности. Считается, что развитие МС сопряжено с длительным приемом антипсихотиков второго поколения, однако не у всех пациентов наблюдают данный побочный эффект, в связи с чем появляются новые данные, указывающие на определенную предрасположенность больных шизофренией к метаболическим нарушениям [1]. Метаболический синдром связан с увеличением генерации реактивного кислорода, что приводит к активации прооксидантных и провоспалительных процессов, которые способствуют снижению чувствительности к инсулину и прогрессированию этого состояния [2]. В поддержании прооксидантного/антиоксидантного баланса в организме принимают участие ферменты классов оксидаз, редуктаз и дегидрогеназ.

Ген NAD(P)H-дегидрогеназа [хинон] 1 (NQO1) состоит из 6 экзонов и расположен на хромосоме 16q22.1. Он кодирует фермент – NQO1, который представляет собой флавопротеин, катализирующий двухэлектронное восстановление эндогенных и экзогенных хинонов до гидрохинонов, а также участвующий в детоксикации супероксидных радикалов до перекиси водорода. Экспрессия NQO1 индуцируется высокими концентрациями свободных радикалов в условиях окислительного стресса. Активность фермента напрямую зависит от присутствия того или иного полиморфного варианта гена. Однонуклеотидный полиморфизм C609T (rs1800566, Pro187Ser) NQO1 приводит к замене пролина на серин и отсутствию ферментативной активности у лиц гомозиготных по Т-аллелю [3]. NQO1 широко экспрессируется в жировой ткани; активация NQO1 посредством окисления NADH/NADPH защищает от ожирения, дислипидемии, нарушения толерантности к глюкозе, артериальной

гипертензии и МС [4]. В популяции психически здоровых лиц с МС полиморфизм С609Т NQO1 был ассоциирован с риском развития дислипидемии, ишемической болезни сердца и сахарного диабета 2 типа [5]. В то же время исследований по изучению ассоциаций полиморфных вариантов гена NQO1 с компонентами МС у больных шизофренией не проводилось. Таким образом, целью нашего исследования было провести ассоциативный анализ полиморфизма rs1800566 NQO1 с компонентами МС у пациентов с шизофренией, длительно получающих антипсихотическую терапию.

Материал и методы исследования

В исследовании приняли участие больные шизофренией из Сибирского региона, длительно принимающих антипсихотическую терапию. Формирование групп пациентов для исследования и клиническая верификация диагнозов выполнена на базе отделения эндогенных расстройств НИИ психического здоровья (руководитель отделения – д.м.н., Е.Г. Корнетова), ОГБУЗ «Томская клиническая психиатрическая больница» (главный врач - С. М. Андреев) и ГКУЗ КО «Кемеровская областная клиническая психиатрическая больница» (главный врач - к.м.н. В.А. Сорокина).

Исследование проводилось в соответствии с этическими принципами исследований с участием человека согласно протоколу, утвержденному локальным этическим комитетом НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Основными критериями включения были: подписанное информированное согласие на участие в исследовании, клинически верифицированный диагноз шизофрении согласно МКБ-10 (F20), принадлежность к европеоидной расе, отсутствие органических или неврологических расстройств, тяжелой соматической патологии, приводящей к органной недостаточности.

МС устанавливали на основании критериев, предложенных Международной федерацией диабета – IDF, 2005: 1) абдоминальное ожирение: окружность талии ≥ 94 см у мужчин или ≥ 80 см у женщин; 2) гипертриглицеридемия: уровень триглицеридов $\geq 1,7$ ммоль/л; 3) снижение липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) $< 1,03$ ммоль/л у мужчин или $< 1,29$ ммоль/л у женщин; 4) артериальная гипертензия: артериальное давление $\geq 130/85$ мм рт. ст.; 5) гипергликемия: уровень глюкозы в плазме натощак $\geq 5,6$ ммоль/л.

Пациенты, получавшие противодиабетические препараты, антигипертензивные средства или статины, считались отвечающими критерию компонента по 5), 4) или 3) соответственно. У обследованных лиц утром натощак отбирали кровь из локтевой вены с последующим выделением геномной ДНК с использованием стандартного фенол-хлороформного микрометода. Полиморфизм rs1800566 NQO1 определяли методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе QuantStudio 5 (Applied Biosystems, США) с использованием наборов TaqMan Assays (оборудование расположено на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ).

Статистический анализ проводился с использованием программы R версии 4.0.4. Распределение частот генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью критерия χ^2 . Оценка риска осуществлялась с помощью показателя отношения шансов (odds ratio, OR) с 95 % доверительным интервалом (95 % ДИ). Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Биоинформатический анализ был проведен с использованием инструментов GTEx Portal (<https://gtexportal.org>) для изучения тканеспецифичной экспрессии гена и mQTLDatabase (<http://www.mqtlldb.org>) для изучения влияния исследуемого полиморфизма на статус метилирования гена.

Результаты

Исследуемую выборку составили 453 больных шизофренией (221 женщина и 232 мужчины). Средний возраст пациентов был $41,0 \pm 12,6$ лет, средний возраст манифестации

заболевания – $25,6 \pm 8,3$ года, средняя длительность шизофрении – $15,4 \pm 10,9$ лет. Согласно критериям IDF, 2005, частота встречаемости МС в выборке составила 31,6 %. Не было обнаружено ассоциаций между изучаемым полиморфизмом и МС. Среди исследуемой популяции было выделено пять подгрупп пациентов, у которых встречались компоненты МС. Частота встречаемости компонентов МС оказалась следующая: абдоминальное ожирение – 49,2 %; артериальная гипертензия – 39,7 %, гипергликемия – 25,9 %, гипертриглицеридемия – 29,8 %, снижение ЛПВП – 62,1 %. Частоты генотипов и аллелей полиморфного варианта rs1800566 гена NQO1 значимо не различались между группами с абдоминальным ожирением и без него, с артериальной гипертензией и без нее, с гипергликемией и без нее, и у лиц с нормальным и сниженным уровнем ЛПВП. Была обнаружена ассоциация полиморфного варианта rs1800566 гена NQO1 с гипертриглицеридемией у больных шизофренией: аллель T rs1800566 обладал predisponирующим (OR: 1,53; 95 % ДИ: 1,08–2,16), а аллель C rs1800566 – защитным (OR: 0,65; 95 % ДИ: 0,46–0,92) эффектом относительно развития гипертриглицеридемии ($p = 0,015$). По данным ресурса GTEx Portal, альтернативный аллель ассоциирован со снижением экспрессии NQO1 в печени, кишечнике, висцеральной и подкожной жировой ткани – в клетках которых преимущественно происходит синтез триглицеридов. При оценке статуса метилирования генов было показано, что наличие мутантного аллеля связано с гиперметилированием NQO1 и, соответственно, со снижением экспрессии этого гена.

Закключение

На основании полученных результатов выявлена ассоциация полиморфизма rs1800566 гена NQO1 с гипертриглицеридемией у больных шизофренией, длительно принимающих антипсихотическую терапию, что может быть обусловлено низкой транскрипционной активностью гена NQO1 у носителей изучаемого полиморфизма. Полученные данные согласуются с литературными результатами о наличии ассоциации полиморфного варианта rs1800566 с дислипидемией у психически здоровых лиц [5] и подтверждает гипотезу об участии окислительного стресса в развитии метаболических нарушений при шизофрении. Дальнейший поиск генетических маркеров будет способствовать разработке эффективных методов диагностики и коррекции метаболических нарушений у больных шизофренией.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-10088, <https://rscf.ru/project/23-75-10088>

Список литературы

1. Федоренко О.Ю., Иванова С.А., Корнетова Е.Г. Роль полиморфизма генов дофаминавой и глутаматной систем в клинической гетерогенности шизофрении и развитии антипсихотик-индуцированных побочных эффектов // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2023. – Т. 1, № 118. – С. 5–13.
2. Varghese J.F., Patel R., Yadav U. Novel insights in the metabolic syndrome-induced oxidative stress and inflammation-mediated atherosclerosis // Current Cardiology Reviews. – 2018. – Vol. 14, № 1. – P. 4–14.
3. Palming J. et al. The expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 is high in human adipose tissue, reduced by weight loss, and correlates with adiposity, insulin sensitivity, and markers of liver dysfunction // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2007. – Vol. 92, № 6. – P. 2346–2352.
4. Шкурят М.А., Машкина Е.В., Милютин Н.П., Шкурят Т.П. Роль полиморфизма редокс-чувствительных генов в механизмах окислительного стресса при ожирении и метаболических заболеваниях // Экологическая генетика. – 2023. – Т. 21, № 3. – С. 261–287.
5. Ross D., Siegel D. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control // Redox Biology. – 2021. – Vol. 41. – P. 101950.

УДК 58.032.3:577.344.2

**Влияние почвенной засухи на фотохимическую активность
фотосистемы II семядолей растений рапса**Д.С. Мельник

Научный руководитель: к.б.н., О.К. Мурган

Национальный исследовательский Томский государственный университет

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

E-mail: melnik.darya.86@gmail.com**Effect of soil drought on the photochemical activity of the
photosystem II in cotyledons of rapeseed plants**D.S. Melnik

Scientific Supervisor: Ph.D., O.K. Murgan

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

E-mail: melnik.darya.86@gmail.com

Abstract. Due to processes associated with climate change, areas susceptible to drought are increasing. Exposure to water stress has negative consequences, especially for oilseeds. In this work, we showed the effect of 1- and 2-week water deficiency on some parameters (Fv/Fm, qP, qN, qL) of the photochemical activity of photosystem 2 in rapeseed plants. It was determined that the maximum reduction in the number of reaction centers by 23.8-29.1 % is achieved after one week of drought, while the efficiency of photosystem 2 during this period decreased unreliably.

Key words: *Brassica napus*, cotyledons, PAM, drought

Введение

Изменение климата приводит к увеличению площадей, подверженных засухе, что представляет собой серьезную проблему для устойчивого земледелия во всем мире. Согласно анализу метеоданных за последнее тридцатилетие в большинстве регионов Российской Федерации засуха наносит наибольший вред в сфере растениеводства [1]. Засуха негативно сказывается на сельскохозяйственных культурах растений, снижая их способность к росту и урожайность, что увеличивает потенциал потерь сельского хозяйства.

В связи с чем, изучение влияния засухи для основных сельскохозяйственных культур является актуальной задачей.

Известно, что дефицит влаги способствует существенному увеличению утечки электролитов и, как следствие, генерации активных форм кислорода (АФК), что оказывает негативное влияние на активность фотосинтеза и кинетику флуоресценции хлорофилла *a*. Вследствие этого замедляются процессы роста и развитие культур, снижая их урожайность [2]. Исходя из этого, измерение и анализ параметров флуоресценции хлорофилла *a* становятся инструментом для изучения стресса у растений, подверженных условиям засухи [3].

Растения рапса чувствительны к водному дефициту, особенно на стадии цветения [2]. Рапс представляет большой интерес, как важная техническая культура. На территории Российской Федерации к 2023 году отмечен наибольший прирост посевных площадей для ярового и озимого рапса, при этом, объем собранной продукции увеличился на 1 721 тыс. тонн [4]. Значение данной культуры заключается в высокой продуктивности масличной продукции и ее широком применении в пищевой, металлургической и текстильной промышленности. Рапс также является высокобелковой кормовой культурой, источником сырья для получения биодизеля, положительно влияет на структуру почвы, поскольку выращивание растений рапса приводит к накоплению органических веществ в почве, что

положительно сказывается на урожайности последующих культур. При этом они являются не только второй по значимости масличной культурой в мире, но и распространённым модельным объектом для фундаментальных исследований.

Экспериментальная часть

Объектом исследования было выбрано растение рапса сорта Хантер (*Brassica napus L.*), как важная масленичная культура требовательная к влаге почвы. Для анализа было отобрано 40 семян рапса, которые стратифицировались во влажной среде при температуре +4 °С в течение трёх суток. Далее в течение двух суток семена проращивали в чашках Петри по 20 шт. Открытые (пророщенные) семена высаживались в контейнеры с увлажнённым почвенным грунтом объемом 1 литр. Часть сосудов с растениями рапса поливались каждые двое суток объемами воды 100 мл – контрольная группа. В оставшихся сосудах моделировались условия засухи методом полного прекращения полива – экспериментальная группа. Растения выращивали на свету, в фитотроне с 16-часовым фотопериодом, при температуре 19–21 °С.

Флуоресценцию хлорофилла *a* оценивали в семядолях через 7, 14 и 21 сутки роста растений рапса в сосудах с почвой при помощи портативного импульсного флуориметра MINI-RAM-II по следующим параметрам: максимальный фотохимический квантовый выход ФС II (F_v/F_m), коэффициенты фотохимического тушения на основе модели «озера» (qP) и модели «лузи» (qP), и нефотохимического тушения (qN). Растения предварительно инкубировали в темноте 30 минут [5].

Результаты

В рамках нашего эксперимента показано, что максимальный квантовый выход второй фотосистемы (F_v/F_m) снижался у растений, подвергнутых однонедельной засухе, однако достоверная разница зафиксирована после двух недель стрессового воздействия (рис. 1). Снижение данного параметра является индикатором стрессового состояния растений [6].

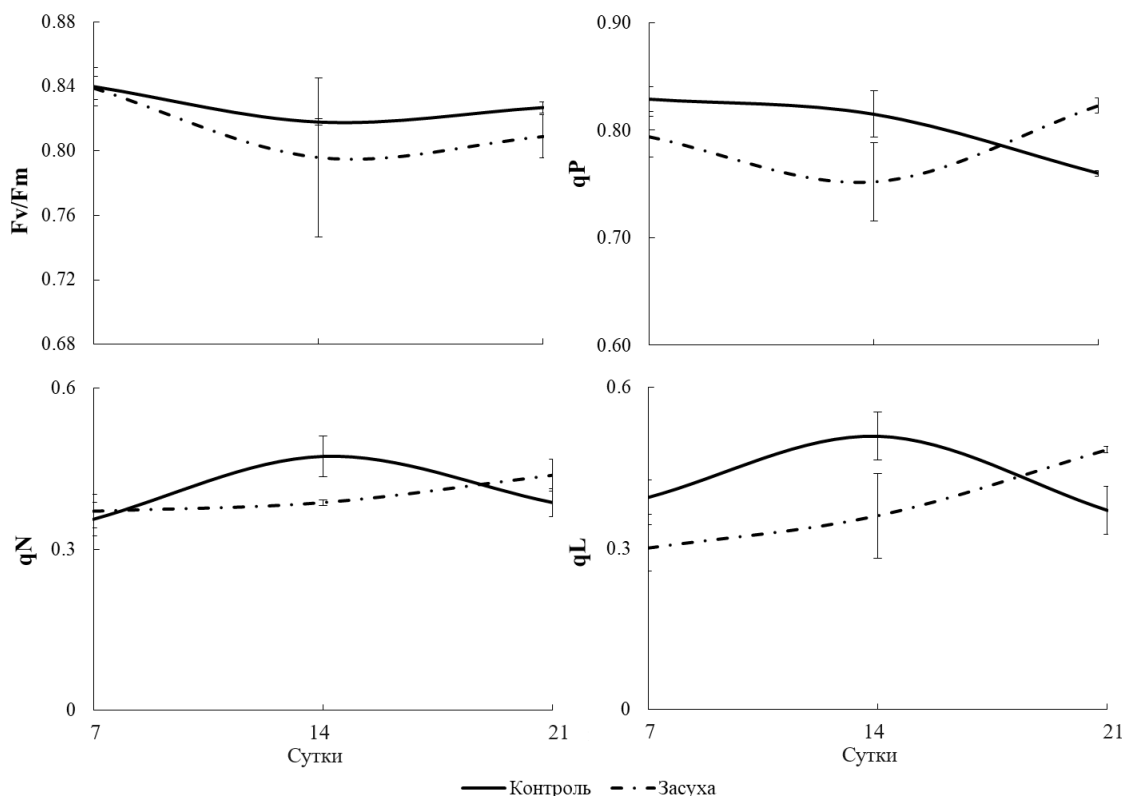


Рис. 1. Влияние почвенной засухи на показатели флуоресценции хлорофилла *a* (F_v/F_m , qP , qN , qL) растений рапса

Коэффициенты фотохимического тушения в семядолях растений рапса также снижались в течение эксперимента. Значения qP и qL растений, подвергнутых стрессу, при первом измерении были ниже контрольных на 4,2 % и 6,7 % соответственно. Максимальное различие для данных параметров было получено через неделю после прекращения полива 23,8 % и 29,1 %. Данные значения указывают на увеличение числа закрытых реакционных центров фотосистемы 2 у семядолей рапса, подверженного стрессу. Коэффициент нефотохимического тушения (qN), зависящий от состояния фотосистемы II и разницы концентрации протонов по обе стороны мембраны тилакоидов [7], аналогичным образом снижался через одну неделю стрессового воздействия (рис. 1).

Также стоит отметить, что значения коэффициентов (qP и qL) в семядолях растений рапса из экспериментальной группы были выше аналогичных значений контрольной группы, что может свидетельствовать о старении семядолей, и как следствии, разрушении реакционных центров.

Заключение

Данный эксперимент показал, что изучение действия засухи на фотохимическую активность второй фотосистемы необходимо осуществлять до трёхнедельного возраста растений, чтобы минимизировать влияния процессов старения семядолей. Также нами продемонстрировано, что полное прекращение полива растений на начальных этапах роста недостоверно снижает параметр Fv/Fm в семядолях растений рапса, что свидетельствует об устойчивости данного сорта (Хантер) к условиям засухи. При этом максимальный негативный эффект засухи отмечен на параметрах, характеризующих, число открытых реакционных центров второй фотосистемы (qP и qL).

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

Список литературы

1. Воробейков Г.А., Бредихин В.Н., Лебедев В.Н., Юргина В.С. Биология критического периода растений в условиях нарушения влажности почвы: к 100-летию со дня рождения профессора В.В. Аникиева // Известия Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена. – 2015. – № 173. – С. 109–121.
2. Batool M., El-Badri A.M., Hassan M.U., Haiyun Y., Chunyun W., Zhenkun Y., Jue K., Wang B., Zhou G. Drought stress in Brassica napus: effects, tolerance mechanisms, and management strategies // Journal of Plant Growth Regulation. – 2023. – № 42. – P. 21–45.
3. Гольцев В.Н., Каладжи М.Х., Кузманова М.А., Аллахвериев С.И. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла a – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений. – Ижевск : Институт компьютерных исследований, 2014. – 220 с.
4. Лукомец А.В. Оценка текущего состояния отечественного рынка семян масличных культур // Сборник материалов 12-й Международной конференции молодых учёных и специалистов «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур». – Краснодар : Изд. ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, 2023. – С. 158–162.
5. Brestic M., Zivcak M. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications // Molecular stress physiology of plants. – India : Springer India, 2013. – P. 87–131.
6. Лысенко В. С., Вардуни Т.В., Соьер В.Г., Краснов В.П. Флуоресценция хлорофилла растений как показатель экологического стресса: теоретические основы применения метода // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 4. – С. 112–120.
7. Гольцев В.Н., Каладжи Х.М., Паунов М., Баба В., и др. Использование переменной флуоресценции хлорофилла для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений // Физиология растений. – 2016. – Т. 63, № 6. – С. 881–907.

УДК 638

**Потенциал накопления отдельных нутриентов
в биомассе модельных видов беспозвоночных**

М.Д. Морозова, В.П. Модяева, К.Е. Скрипцова

Научный руководитель: доцент, д.б.н., А.В. Симакова

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

E-mail: science.margarita145@list.ru

A potential of particular nutrient accumulation in the biomass of invertebrate model species

M.D. Morozova, V.P. Modyaeva, K.E. Skriptcova,

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., Dr., A.V. Simakova

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

E-mail: science.margarita145@list.ru

Abstract. The present study is devoted to an analysis of particular nutrients within the biomass of two model species of terrestrial invertebrates: the House cricket *Acheta domesticus* Linnaeus, 1758 and the redworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). The accumulation levels of particular nutrients of potential value for human consumption in these species differ significantly. Enrichment of their feeding substrate with precursors can maintain and indeed increase these levels.

Key words: invertebrates, biomass, nutrients, changing.

Введение

Потребность в новых источниках пищи, богатых животным белком и сбалансированных по составу питательных веществ – новый и устойчивый тренд в мировой индустрии агробизнеса [1, 2]. Одним из наиболее перспективных направлений в настоящее время является использование наземных беспозвоночных для получения насыщенной нутриентами биомассы [3].

В рамках проекта РНФ № 23-26-00075 «Нутриенты наземных беспозвоночных – источник пищевого сырья нового качества» коллективом ученых ТГУ проведена работа по разработке способа получения такой биомассы: подобраны перспективные для промышленного выращивания виды, определены требования к содержанию и кормлению, установлен нутриентный состав модельных видов [3, 4].

Проводимая работа отвечает приоритетным направлениям Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации (СНТР) «Переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, ... создание безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания» в рамках биоинженерии как критической технологии РФ.

В качестве одного из направлений исследования питательной ценности биомассы беспозвоночных было выбрано определение возможности накопления отдельных нутриентов или повышение уровня их содержания [5]. Полученные данные могут использоваться для проектирования нутриентного состава, т.е. получения биомассы с заданными параметрами питательных веществ или отдельных нутриентов для создания продуктов функционального питания, сбалансированных по суточной потребности человека и животных [4].

Материалы и методы исследования

В проводимом эксперименте в качестве модельных были выбраны два вида беспозвоночных: домовый сверчок *Acheta domesticus* (Linnaeus, 1758) и красный калифорнийский червь *Eisenia fetida* (Savigny, 1826).

Эксперимент проводился в пяти группах у каждого вида (сверчков и червей), содержащихся в одних и тех же условиях. Первая группа – контрольная, в ней беспозвоночных выращивали на пищевом субстрате без доведения предшественников нутриентов. Вторая группа получала в пищевой субстрат витамины С и В7, третья группа потребляла субстрат с минеральной комплексной добавкой, четвертая – с дополнительными витаминами В1 (тиамин), В9 (фолаты), В3 (ниацин), и пятая – жирорастворимые витамины А, D, Е, К.

Культуры содержались в лабораторных условиях при комнатной температуре около +25°C и влажности около 60 %. Каждый вид беспозвоночных из каждой группы размещался в отдельный пластиковый контейнер, в который добавлялся пищевой субстрат с соответствующим обогащением или без него. Подробное описание методики приведено в работе Tshernyshev et al., 2023 [6]. Замороженные навески биомассы были переданы в сертифицированную лабораторию ООО «Сибтест» г. Томск для проведения анализов.

Статистический анализ проведен с использованием R version 4.0.2. [7]. При изучении влияния добавления нутриентов в пищевой субстрат использовался анализ данных с оценочными графиками.

Результаты

Анализ питательных веществ в сырой биомассе модельных видов показал неравномерный уровень нутриентов и пищевой ценности. Так, количество белка, зарегистрированное у червей (17,6 %) и сверчков (16,9 %) значительно не отличается, но у сверчков больше зольности (1,44 %), жиров (2,03 %), углеводов (35,0 %) и хитина (4,05 %). У сверчков также наибольшее значение калорийности (226,4 ккал). Минимальные значения многих параметров оказались у червей: зольность (0,40 %), жиры (0,27 %), хитин (0,08 %), углеводы (10,6 %) и калорийность (115,2 ккал).

Из жирорастворимых витаминов, содержание витаминов Е (3,77 мг/100 г) и К (7,765 мкг/100 г) наибольшее у червей, а у сверчков А (4,75 мкг/100 г) и D3 (0,058 мкг/100 г). Минимальные значения зафиксированы: витамина Е у сверчков (2,083 мг/100 г), А – у червей (0,79 мкг/100 г), D3 у червей (0,026 мкг/100 г) и К – у сверчков (6,558 мкг/100 г).

Наибольшие значения витаминов группы В зафиксированы для витамина В1 (1,223 мг/100 г), В2 (9,369 мг/100г) и В3 (22,347 мг/100г) у червей и В9 у сверчков (0,122 мг/100 г). Минимальные значения этих же витаминов отмечены: у сверчков В1 (0,033 мг/100 г), В2 (3,226 мг/100 г) и В3 (3,292 мг/100 г), В9 (0,029 мг/100 г) у червей.

После обогащения пищевого субстрата прекурсорами анализ нутриентного состава биомассы выявил неоднородность накопления конкретных питательных веществ по сравнению с контрольной группой, как в сторону увеличения, так и стабилизации уровня их содержания.

Так, общие показатели оказались максимальными: количество белка у червей (21,6 %), содержание зольности (1,9 %), жиров (2,84 %), углеводов (32,7 %), хитина (9,98 %) и значение калорийности (239,6 ккал) у сверчков. Минимальные значения тех же параметров оказались: у сверчков белки (17,3 %), зольность (0,58 %), содержание жиров (0,94 %), углеводов (3,38 %), хитина (0,06 %), минимальные значения калорийности (112 ккал) отмечены у червей.

Из жирорастворимых витаминов, содержание витамина Е сильнее увеличилось у червей (5,829 мг/100 г), витаминов А (6,995 мкг/100 г), D3 (0,084 мкг/100 г) и К – у сверчков (7,605 мкг/100 г). Минимальные значения зафиксированы: витамина Е у сверчков (2,056 мг/100 г), а витаминов А (1,260 мкг/100 г), D3 (0,047 мкг/100 г) и К (1,829 мкг/100 г) у червей.

Больше всего увеличилось содержание витаминов группы В у червей (витамин В1 (1,182 мг/100 г), В2 (13,6 мг/100 г) и В3 (31,527 мг/100 г) и В9 у сверчков (0,134 мг/100 г). Минимальные значения этих же витаминов отмечены: у сверчков В1 (0,032 мг/100г), В2 (2,879 мг/100 г) и В3 (4,445 мг/100 г), у червей В9 (0,040 мг/100 г).

Таким образом, внесение прекурсоров нутриентов в пищевой субстрат модельных видов привел как к увеличению уровня отдельных питательных веществ, так и к их некоторому снижению. Уровень содержания отдельных нутриентов оставался почти неизменным, что может говорить о некотором максимально допустимом содержании их у этих видов.

Заключение

1. Установлено, что у разных видов беспозвоночных уровень накопления отдельных нутриентов существенно различается.

2. При обогащении субстрата прекурсорами, в первую очередь увеличивается уровень нутриентов, содержание которых было изначально повышено относительно других видов беспозвоночных.

3. Ряд нутриентов имеет предел насыщения в биомассе, и по достижении его уровень этих нутриентов стабилизируется.

Несмотря на то, что в настоящее время в России разрешена к употреблению только биомасса домашнего сверчка, проведенные сравнительные исследования показывают ценность использования биомассы других видов беспозвоночных для получения продукции с заданным содержанием конкретных нутриентов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-26-00075.

Список литературы

1. Gorbunova N.A., Zakharov A.N. Edible insects as a source of alternative protein. A review // Theory and practice of meat processing. – 2021. – Vol. 6, № 1. – P. 23–32.
2. Zielinska E., Baraniak B., Karas M. et al. Selected species of edible insects as a source of nutrient composition // Food Research International. – 2015. – Vol. 77. – P. 460–466.
3. Tang C., Yang D., Liao H. et al. Edible insects as a food source: a review // Food Production, Processing and Nutrition. – 2019. – Vol. 1, № 1. –P. 1–13.
4. Тутелян В.А., Никитюк Д.Б., Аксенов И.В. и др. О новых (2021) Нормах физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации // Методические рекомендации МР 2.3.1.0253-21. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора РФ, 2021. – 72 с.
5. Морозова М.Д., Чернышев С.Э., Багиров Р.Т-о. и др. Проектирование нутриентного состава биомассы наземных беспозвоночных // Сборник тезисов X Международной конференции молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов. – Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2023. – С. 191–192.
6. Tshernyshev S.E., Babkina I.B., Modyaeva V.P. et al. Invertebrates of Siberia, a potential source of animal protein for innovative food production. 1. The keelback slugs (Gastropoda: Limacidae) // Acta Biologica Sibirica. – 2022. – Vol. 8. – P.749–762.
7. R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing // R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. – URL:<https://www.R-project.org/>.

УДК 576.535

**Фенотипирование макрофагов человека THP-1 под действием трематоды
*Opisthorchis felineus***Д.В. Пономарев, О. Запарина, Е.А. Лишай

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

Институт Цитологии и Генетики СО РАН,

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

E-mail: p.dmitr@outlook.com**Human macrophage THP-1 phenotype in response to the trematode
*Opisthorchis felineus***D.V. Ponomarev, O. Zaporina, E.A. Lishai

Scientific Supervisor: Dr., M.Yu. Pakharukova

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

E-mail: p.dmitr@outlook.com

Abstract. *Opisthorchiasis is an infection caused by the trematode Opisthorchis felineus, affecting the hepatobiliary system of mammals, including humans. The pathogenesis of opisthorchiasis is complex and involves mechanical damage and immunomodulatory effects of the parasite excretory-secretory product. Macrophages play a crucial role in the host's immune response to parasitic invasion, and their polarization can be altered by Opisthorchis felineus and its ES product. However, the impact of the parasite on macrophage polarization remains unclear. This study is aimed to investigate the effect of Opisthorchis felineus and its ESP on the polarization of PMA-activated THP-1-derived macrophages. Our results demonstrate that both the parasite and its ESP drive the immune response towards an anti-inflammatory pathway, as evidenced by decreased expression of pro-inflammatory cytokines INF γ and IL-17, and elevated expression of anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-4. These findings suggest that Opisthorchis felineus and its ES product modulate macrophage polarization, favoring a phenotype that may contribute to parasite survival during chronic infection by suppressing the host's active immune response. RNAseq analysis revealed 147 differentially expressed genes, of which 38 genes increased and the expression of 109 genes was reduced by more than 1.5 times compared to untreated cells. This study highlights the importance of further research on the immunomodulatory effects of Opisthorchis felineus to clarify the host-parasite relationship and develop more effective therapeutic strategies for opisthorchiasis treatment.*

Key words: *Opisthorchis felineus, THP-1 cells, Excretory-secretory product, cytokines.*

Введение

Описторхоз – заболевание из группы трематодозов, вызываемое гельминтами *Opisthorchis felineus*, которые паразитируют в гепатобилиарной системе млекопитающих, включая человека. Описторхоз может протекать в хронической форме, не проявляясь годами. Хроническое течение описторхоза может быть связано с нарушением одного из ключевых аспектов иммунного ответа хозяина в ответ на паразитарную инвазию – с активацией макрофагов. Макрофаги представляют собой важный структурный элемент иммунологической защиты, поскольку первыми реагируют на патоген, что, в свою очередь, запускает иммунный ответ. В результате активации могут образоваться макрофаги провоспалительного фенотипа M1, либо противовоспалительного фенотипа M2. Поляризация макрофагов может быть изменена в результате влияния *Opisthorchis felineus* и выделяемого им экскреторно-секреторного продукта, в состав которого входят различные белки и регуляторные молекулы [1, 2]. Однако, на сегодняшний день нет данных о влиянии *Opisthorchis felineus* и его экскреторно-секреторного продукта на поляризацию макрофагов. Результаты данного исследования помогут в изучении ответа хозяина

млекопитающего при описторхозе, вызываемом *Opisthorchis felineus*. Цель работы: исследовать иммунофенотип макрофагов человека THP-1 под действием трематоды *Opisthorchis felineus*. Поставлены следующие задачи: 1. Провести фенотипирование клеток макрофагов человека THP-1 с использованием антител против INF γ , IL-17, IL-10 и IL-4 после со-культивирования клеток с трематодами *Opisthorchis felineus*, а также инкубации клеток с экскреторно-секреторным продуктом трематод. 2. Выявить дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) и функционально обогащенные пути в клетках THP-1 при со-культивировании с трематодами *Opisthorchis felineus*.

Экспериментальная часть

Исследование проводили на общепринятой модели для изучения иммунного ответа – моноцитарной клеточной линии человека THP-1. Клетки культивировали в среде RPMI-1640, с 10 % FBS и пенициллином-стрептомицином при 37 °C с 5 % CO₂. Для индукции дифференцировки клетки обрабатывали Форбол-12-миристат-13-ацетатом. Взрослые особи *Opisthorchis felineus* были получены из желчных протоков печени хомяков *Mesocricetus auratus*, инфицированных метацеркариями *Opisthorchis felineus*. Экскреторно-секреторный продукт и его фракции получали при помощи метода мембранной ультрафильтрации сред, в которых культивировали взрослых особей *Opisthorchis felineus*. Клетки THP-1 разделили на три группы: (1) Контрольные клетки THP-1 культивировали в стандартной среде, клетки группы (2) культивировали в стандартной среде с 30 мкг/мл экскреторно-секреторного продукта, а клетки группы (3) со-культивировали с тремя взрослыми особями *Opisthorchis felineus* в специальных вставках с порами размером 1 мкм. После обработки клетки готовили для окрашивания и анализа на проточном цитометре BD Accuri C6 Plus (Becton Dickinson, USA). После фиксации клетки окрашивали флуоресцентными антителами против INF γ , IL-17, IL-10 и IL-4 (BioLegend, USA). Данные анализировали с помощью программы FlowJo (FlowJo LLC USA), определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI). Данные представлены как средняя интенсивность флуоресценции $\pm$ стандартная ошибка среднего (MFI $\pm$ SE). Шесть библиотек для секвенирования РНК (по три образца на группу) из клеток группы 1 и 3 были приготовлены в соответствии со стандартным протоколом New England Biolabs. Полиаденилированную мРНК очищали из 1 мкг тотальной РНК с помощью модуля NEBNext Poly(A) mRNA. С использованием набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit для Illumina были созданы направленные цепь-специфичные библиотеки кДНК. Селекцию фрагментов ДНК по размеру проводили на гранулах Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США). Затем было проведено ПЦР-обогащение библиотеки, лигированной адаптером (шесть циклов ПЦР). Секвенирование полученных библиотек проводилось компанией BGI (Китай) на платформе Illumina HiSeq 2500 методом парных прочтений 2 X 150 пар оснований. Качество библиотек проверяли с использованием программы FastQC. Картирование последовательностей на геном человека (GRCh38-hg38) проводили с помощью программы STAR. Для анализа дифференциальной экспрессии генов использовали тест Вальда с порогом 0,05 из R-пакета DESeq2. К полученным после анализа значениям вероятности применяли поправку на множественные сравнения (Бенджамини-Хохберга) и определяли гены как дифференциально экспрессирующиеся, если скорректированное значение $P_{adj} < 0,05$ и экспрессия генов меняется более чем в 1,5 раза. Из матрицы экспрессии удаляли низкоэкспрессирующиеся гены (сумма значений экспрессии гена по всем библиотекам менее 120). Результаты, полученные с помощью проточной цитометрии, были проанализированы с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0 и Microsoft Excel. В ходе анализа полученных данных определяли средние арифметические значения, среднеквадратичное отклонение. Для оценки статистических различий между выборками использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости p-value менее 0,05.

Результаты

Мы продемонстрировали индивидуальные различия в профиле экспрессии ряда цитокинов среди этих трех групп макрофагов. Уровень INF γ в группе 2 (ESP) был ниже, по сравнению с контрольной группой (5488 ± 380 против 10348 ± 110 , $p = 0,02$). В группе 3 (*O. felineus*) уровень INF γ также был ниже, по сравнению с контрольной группой (5732 ± 33 против 10348 ± 110 , $p = 0,001$). Уровень IL-17 в группе 2 (ESP) был ниже, по сравнению с контрольной группой (1069 ± 130 против 3092 ± 280 , $p = 0,003$). В группе 3 (*O. felineus*) уровень IL-17 также был ниже, по сравнению с контрольной группой (1792 ± 508 против 3092 ± 280 , $p = 0,01$). Уровень IL-10 в группе 2 (ESP) был выше, по сравнению с контрольной группой (21590 ± 346 против 3094 ± 296 , $p = 0,001$). В группе 3 (*O. felineus*) уровень IL-10 был выше, по сравнению с контрольной группой (5070 ± 952 MFI против 3094 ± 296 , $p = 0,01$). Уровень IL-4 в группе 2 (ESP) был выше, по сравнению с контрольной группой (5357 ± 267 против 3142 ± 246 , $p = 0,04$). Таким образом, *Opisthorchis felineus* и его экскреторно-секреторный продукт может модулировать поляризацию макрофагов, полученных из РМА-активированных клеток ТНР-1, изменяя фенотип на противовоспалительный, что проявляется в снижении экспрессии провоспалительных цитокинов INF γ и IL-17 и увеличении экспрессии противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-4. При оценке экспрессии генов при со-культивировании с трематодами было получено 147 дифференциально-экспрессирующихся генов, из них повышались более чем в полтора раза 38 генов, и экспрессия 109 генов была снижена более чем в полтора раза по сравнению с контрольными значениями. Анализ функционального обогащения генов был проведен с использованием пакета clusterProfiler для R по базам данных GO, MSigDB (Hallmark) и KEGG. Среди генов со сниженной экспрессией были представлены пути мишени HDAC, подавленные с помощью метилирования, а также пути, регулирующиеся через интегрин 2. Среди генов с повышенной экспрессией было обнаружено значимое обогащение путей воспалительного ответа, путей, ассоциированных с миеломой, активацией генов-мишеней GATA2, системы комплемента, и многих других.

Заключение

В литературе существуют данные, что длительному паразитированию в организме хозяина способствует избегание или подавление иммунного ответа. Избегание иммунитета хозяина реализуется путем нарушения активации клеток, которые первые реагируют на патоген – макрофагов, ключевой структурой в инициации иммунного ответа [1]. Данное исследование демонстрирует, что *Opisthorchis felineus* и его экскреторно-секреторный продукт могут модулировать поляризацию макрофагов, полученных из РМА-активированных ТНР-1, направляя его в сторону противовоспалительного пути, что может способствовать выживанию паразита во время хронической инфекции, подавляя активный иммунный ответ хозяина. Модулирование иммунного ответа является важной частью взаимоотношений «паразит-хозяин» и подчеркивает актуальность дальнейших исследований в этой области для лучшего понимания механизмов, лежащих в основе иммуномодулирующих эффектов *Opisthorchis felineus* и его экскреторно-секреторного продукта.

Работа поддержана грантом РФФ №24-44-00048.

Список литературы

1. Quinteros S.L., O'Brien B., & Donnelly S. Exploring the role of macrophages in determining the pathogenesis of liver fluke infection. // Parasitology. – 2022. – № 149 (10). – P. 1364–1373.
2. Bility M.T., Sripa B. Chronic *Opisthorchis viverrini* infection and associated hepatobiliary disease is associated with iron loaded M2-like macrophages. // Korean Journal of Parasitology. – 2014. – № 52 (6). – P. 695–699.

УДК 616.127-005.8: 616.127-002

A First Look at the Chemical Composition of Thromboaspirate in Myocardial Infarction Patients Through Mass Spectrometry

N.A. Poponina¹, K.I. Kazantseva¹, V.S. Sidelnikov¹, A.E. Gombozhapova², O.A. Mayboroda¹,
V.V. Ryabov², E. E. Ivanyuk¹

Scientific Supervisor: PhD., O.A. Mayboroda¹, Dr., V.V. Ryabov²

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

² Federal State Budgetary Scientific Institution Tomsk National Research Medical Center of the
Russian Academy of Sciences, Russia, Tomsk, Kievskaya st., 111a, 634012

E-mail: poponina.na@yandex.ru

Abstract. *This research presents an untargeted, descriptive metabolomic analysis of thromboaspirate samples from myocardial infarction patients, considering the molecular phenotype associated with this condition. In total, 55 metabolites across 15 organic compound classes were identified, with the majority belonging to glycerophospholipids, fatty acyls, organooxygen compounds, and organic sulfuric acids and derivatives.*

Key words: *no-reflow phenomenon, myocardial infarction, metabolomics.*

Introduction

The no-reflow phenomenon is characterized by insufficient myocardial perfusion in a segment of the coronary circulation without angiographic evidence of mechanical obstruction. Primarily caused by the distal embolism of coronary arteries due to atheromatous and thrombotic debris, this phenomenon can occur spontaneously and adversely affect prognosis [1]. Despite its clinical significance, the mechanisms underlying no-reflow have yet to be fully elucidated. Metabolomics offers a powerful analytical framework to study metabolites, which are the end products and intermediates of metabolism. Through metabolomic profiling, it is possible to describe the molecular phenotype of an organism and monitor physiological responses to the pathological changes and environmental stressors [2]. To date, several metabolomic studies have reported alterations in three lipid classes – phosphatidylcholine, alkylphosphatidylcholine, and sphingomyelin – in blood of the patients with confirmed no-reflow [3–5]. In this study, we analyze a unique biological material, thromboaspirate, obtained from the myocardial infarction zone.

This study aims to provide an untargeted, descriptive metabolomic analysis of thromboaspirate samples from myocardial infarction patients, offering insights into the molecular phenotype associated with this condition.

Research methods

All study participants provided informed consent. Clots extracted during aorto-coronary bypass surgery were immediately stored in cryovials at -80°C. Untargeted metabolomic profiling was conducted using HPLC-MS/MS, with sample preparation following the Folch method [6]. Analysis was performed on an Agilent 1260 liquid chromatograph coupled with an Agilent 6550 quadrupole time-of-flight mass spectrometer. Metabolite identification utilized the Human Metabolome Database.

Results

We present a descriptive, qualitative analysis of thromboaspirate samples from two myocardial infarction patients. In total, 55 metabolites across 15 organic compound classes were identified, with the majority belonging to glycerophospholipids, fatty acyls, organooxygen compounds, and organic sulfuric acids and derivatives (*Table 1* presents some of the study's results). To our knowledge, this is the first mass spectrometry-based report detailing the chemical composition of thromboaspirate.

Table 1

Some results of metabolomic profiling of thromboaspirate

№	Putative metabolite name	Metabolite class	Molecular formula	ES(+) theor. m/z	ES(+) found m/z	ES(-) theor. m/z	ES(-) found m/z	m/z error (ppm)	m/z error (mDa)	Reference s (ID)	Identification level
1	(S)-3-Mercaptohexyl pentanoate	Fatty Acyls	C ₁₁ H ₂₂ O ₂ S	219.1419	219.1422	-	-	1.4119	0.3094	HMDB0038945	4
2	2-hydroxy-3-(sulfooxy)benzoic acid	Organic sulfuric acids and derivatives	C ₇ H ₆ O ₇ S	-	-	232.9756	232.9761	2.1461	0.5000	HMDB0134105	4
3	Neriantogenin	Steroids and steroid derivatives	C ₂₃ H ₃₂ O ₄	373.2379	373.2388	-	-	2.4127	0.9005	HMDB0030044	4
4	Deoxyadenosine	Purine nucleosides	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	-	-	250.0940	250.0952	4.8010	1.2007	HMDB0000101	5
5	LysoPC(16:1/0:0)	Glycerophospholipids	C ₂₄ H ₄₈ N ₂ O ₇ P	494.3247	494.3203	-	-	8.8594	4.3794	HMDB0010383	5
6	Cortisol 21-sulfate	Sulfated steroids	C ₂₁ H ₃₀ O ₈ S	-	-	441.1583	441.1634	11.5625	5.1009	HMDB0062779	5
7	Phenylalanyphenylalanine	Amino acids, peptides, and analogues	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₃	-	-	311.1395	311.1325	22.4979	7.0000	HMDB0013302	5
8	Enterodiol	Dibenzylbutane lignans	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	-	-	301.1440	301.1528	29.3242	8.8308	HMDB0005056	5
9	DG(16:0/20:3(5Z,8Z,11Z)/0:0)	Glycerolipids	C ₃₉ H ₇₀ O ₅	619.5302	619.5211	-	-	14.6327	9.0654	HMDB0007110	5
10	Coproporphyrin III	Tetrapyrroles and derivatives	C ₃₆ H ₃₈ N ₄ O ₈	655.2768	655.2870	-	-	15.5595	10.1958	HMDB0000570	5
11	4-Hydroxy-5-(phenyl)-valeric acid-O-glucuronide	Organooxygen compounds	C ₁₇ H ₂₂ O ₉	371.1342	371.1238	-	-	28.0823	10.4223	HMDB0059980	5
12	(-)-epicatechin-3'-O-glucuronide	Flavonoids	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	453.1397	453.1270	-	-	28.0302	12.7016	HMDB0029164	5
13	Adenosine 5'-pentaphosphate	Purine nucleotides	C ₁₀ H ₁₈ N ₅ O ₁₉ P ₅	-	-	665.9206	665.9340	20.1736	13.4340	HMDB0059647	5
14	Tetrahydrobiopterin	Pteridines and derivatives	C ₉ H ₁₅ N ₅ O ₃	242.1253	242.1098	-	-	64.1379	15.5294	HMDB0000027	5
15	Psychosine sulfate	Sphingolipids	C ₂₄ H ₄₇ N ₂ O ₁₀ S	-	-	540.2842	540.2653	34.9816	18.9000	HMDB0013046	5

Conclusion

Although our small sample size precludes definitive conclusions, we provide a preliminary characterization of the chemical composition and validate an analytical workflow for future research. Further studies with larger sample sizes are essential to validate these findings and explore their implications for patient prognosis and treatment.

References

1. Eeckhout E, Kern M.J. The coronary no-reflow phenomenon: a review of mechanisms and therapies // *European Heart Journal*. – 2001. – № 9. – P. 729–739.
2. Yang Chen, En-Min Li, Li-Yan Xu Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow // *Metabolites*. – 2022. – № 12. – P. 1–20.
3. Surendran A., Aliani M. & Ravandi A. Metabolomic characterization of myocardial ischemia-reperfusion injury in ST-segment elevation myocardial infarction patients undergoing percutaneous coronary intervention. // *Scientific Reports*. – 2019. – № 9 (1). – P. 11742–11749.
4. Surendran A., Atefi N., Ismail U., Shah A., Ravandi A. Impact of myocardial reperfusion on human plasma lipidome // *iScience*. – 2022. – № 25 (2). – P. 103828–103835.
5. Surendran A., Ismail U., Atefi N., Bagchi A.K., Singal P.K., Shah A., Aliani M., Ravandi A. Lipidomic Predictors of Coronary No-Reflow // *Metabolites*. – 2023. – № 13 (1). – P. 79–83.
6. Eggers L.F., Schwudke D. *Encyclopedia of Lipidomics*. – Dordrecht : Springer, 2016.

УДК 615.076.7

**Влияние расположения ABD на таргетные свойства нового бивалентного
терапевтического конъюгата на основе DARPIn G3**А.А. Прач¹, В.В. Боденко^{1,2}, А.С. Фоминых¹

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

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050²Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050E-mail: nastya.prach@mail.ru**The effect of ABD location on the target properties of a novel bivalent
therapeutic conjugate based on DARPIn G3**A.A. Prach¹, V.V. Bodenko^{1,2}, A.S. Fominykh¹

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., |Ph.D., E.V. Plotnikov

¹Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050²Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow Trakt str., 2, 634050E-mail: nastya.prach@mail.ru

Abstract. *In the present study, we conducted an in vitro and in vivo study of therapeutic conjugates based on the cytotoxic agent emtansine and hybrid proteins consisting of two DARPIn G3 molecules fused with albumin-binding domain.*

Key words: *targeted therapy, scaffold proteins, ovarian cancer, DARPIn G3, HER2, emtansin.*

Введение

HER2 – тирозинкиназный рецептор эпидермального фактора роста, который часто гиперэкспрессируется при различных видах рака, в частности при раке яичников. Одной из причин высокой смертности при раке яичников, несмотря на разнообразие методов лечения, является его позднее выявление и, таким образом, широкое распространение метастазов в брюшной полости. Примерно 70 % случаев рака яичников диагностируются на поздней стадии, а 5-летняя выживаемость таких пациенток составляет всего 17 % [1]. На сегодняшний день не существует оптимальной стратегии лечения рака яичников, однако в качестве стандарта первой линии лечения были установлены сочетание цитотоксических средств на основе платины и конъюгатов на основе моноклональных антител (mAb) с цитотоксическим агентом таких как бевацизумаб и карбоплатин/паклитаксел [2].

Каркасный белок DARPIn G3 обладает небольшими размерами (14–18 кДа), пикомолярной аффинностью к рецептору HER2 (91 пмоль/л) и высокой термостабильностью [3]. Чтобы преодолеть ограничение, связанное с быстрым клиренсом, было разработано несколько стратегий продления периода полураспада [4]. Одна из этих стратегий основана на слиянии с альбуминсвязывающим доменом (ABD), который за счет нековалентного взаимодействия с альбумином человека снижает захват в почках [5].

Таким образом целью данной работы является исследование терапевтических конъюгатов на основе цитотоксического агента эмтамзина и гибридных белков, состоящих из двух молекул DARPIn G3, к C- или к N-концу которых присоединен альбумин-связывающий домен.

Экспериментальная часть

Наработка и выделение белка. Рекомбинантные штаммы-продуценты получали с плазмид рЕТ39b-SUMO-HE3-G3-G3-ABD-E3C и рЕТ39b-SUMO-HE3-ABD-G3-G3-E3C путем трансформации штамма *E. coli*. Каркасные белки экспрессировались в слитом виде с альбуминсвязывающим доменом (ABD), белковые домены были соединены линкерами с

аминокислотной последовательностью (GSS)₃. N-конец белка снабжен последовательностью (HE)₃, а C-конец последовательностью EEEС.

Конъюгация с эмтанзином. На первой стадии для уменьшения количества потенциально окисленных цистеинов к раствору белков добавляли молярный избыток дитиотреитола с последующей инкубацией при 40 °С в течение 1 ч. Затем к восстановленным белкам добавляли 5-кратный молярный избыток эмтанзина (DM1) (DC Chemicals Limited, Китай) с последующей инкубацией при 40 °С в течение 1 ч, а затем в течение ночи при 4 °С. Непрореагировавший с белками DM1 очищали с помощью колонок NAP-5 (Cytiva, Великобритания). Процесс конъюгации с хлорацетамидом (CAA) близок к конъюгации с DM1. После первой стадии восстановления к белкам добавляли свежерастворенный молярный избыток хлорацетамида с последующей инкубацией в течение 30 минут при комнатной температуре в темном месте. Непрореагировавший с белками CAA очищали с помощью колонок NAP-5.

Исследования in vitro. Для исследований in vitro терапевтические конъюгаты метили ^{99m}Tc путем хелатирования карбонильного технеция-99m аминокислотной последовательностью (HE)₃, расположенной на N-конце белков. Интернализация терапевтических конъюгатов оценивалась с использованием метода кислотной промывки при инкубации клеток SKOV-3 с раствором меченных конъюгатов с временными точками от 1 ч до 24 часов [6]. Аффинность связывания GGA-DM1 и AGG-DM1, меченных технецием-99m, с клетками SKOV-3 оценивали по достижению насыщения рецепторов в концентрациях от 0,2 до 40 нМ. Специфичность связывания изучали на клеточных линиях: SKOV3, SKBR3, PC-3, A-431, BT-474. В контрольных чашках для насыщения клеточных рецепторов клетки предварительно инкубировали с избытком немеченого DARPin G3. Чтобы оценить влияние человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) на специфичность связывания, для ранее описанного эксперимента использовали среду, содержащую ЧСА. Эксперимент проводили в трех повторениях.

Исследования in vivo. Для оценки фармакокинетики, было проведено исследование биораспределения с использованием здоровых мышей, 48 самок мышей CD1 были разделены на группы по четыре мыши в каждую временную точку. Мышам внутривенно вводили [^{99m}Tc]Tc-G3-G3-ABD-DM1, [^{99m}Tc]Tc-ABD-G3-G3-DM1 или [^{99m}Tc]Tc-G3-ABD-DM1, [^{99m}Tc]Tc-ABD-G3-DM1 в фосфатно-солевого буфере с 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА). Для изучения внутривенного введения в сравнении с внутрибрюшинным введением был выбран конъюгат с наиболее удачным фармакокинетическим профилем.

Результаты

Оба конъюгата GGA и AGG были эффективно мечены ^{99m}Tc, радиохимический выход составил 82 % и 77 % соответственно, радиохимическая чистота после очистки была выше 99 %. Ассоциация конъюгатов с клетками линии SKOV3 была плавной, достигая до 99,6 % для [^{99m}Tc]Tc-G3-G3-ABD-DM1 после 6 часов инкубации. Уровень интернализированной радиоактивности для [^{99m}Tc]Tc-G3-G3-ABD-DM1 и [^{99m}Tc]Tc-ABD-G3-G3-DM1 увеличивался со временем и через 24 ч составлял 48,4 ± 7,1 % и 45,1 ± 1,4% от клеточно-ассоциированной активности соответственно. Значения равновесных констант диссоциации (K_D) были сопоставимыми и находились в наномолярном диапазоне для обоих конъюгатов. Изучение специфичности in vitro терапевтических конструкций продемонстрировало, что связывание с клетками было специфичным (рис. 1), пропорционально уровню экспрессии HER2 в клеточных линиях, при этом связанная с клетками радиоактивность значительно снижалась, когда HER2-рецепторы были предварительно насыщены (блокированы) немеченым DARPin G3. Значения специфичности связывания были немного ниже для обоих конъюгатов в присутствии ЧСА.

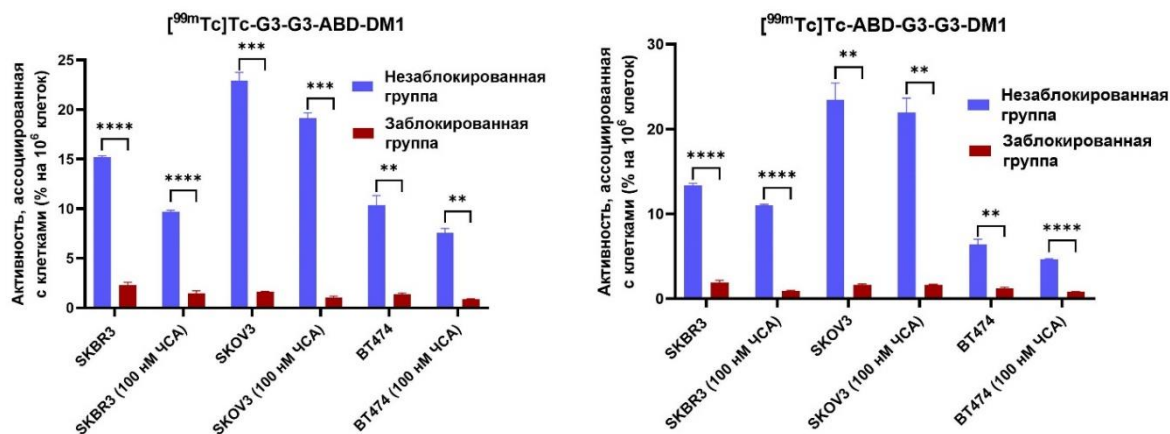


Рис. 1. Специфичность связывания конъюгатов с клетками SKBR3, SKOV3 и BT474 в присутствии и отсутствии ЧСА

Для оценки фармакокинетики, было проведено исследование биораспределения *in vivo* с использованием здоровых мышей. Исследуемые варианты продемонстрировали накопление в почках. При этом наиболее высокие показатели активности в крови и в почках были в [^{99m}Tc]Tc-G3-ABD-DM1 и [^{99m}Tc]Tc-ABD-G3-DM1, чем в бивалентных конъюгатах. В целом вариант [^{99m}Tc]Tc-G3-ABD-DM1 характеризуется более благоприятной картиной фармакокинетического профиля. Сравнивая пути внутрибрюшинного и внутривенного введения для [^{99m}Tc]Tc-G3-ABD-DM1, мы обнаружили, что, как и ожидалось, наблюдались статистические различия в поглощении в брюшной полости.

Заключение

Сконструированные белки на основе DARPIn G3, слитые с ABD и нагруженные эмтанзином, продемонстрировали специфичность связывания к HER2-экспрессирующими клеточными линиями, а аффинность обоих конъюгатов к клеткам SKOV3 была в наномолярном диапазоне. Концентрация активности бивалентных конъюгатов в крови и почках была значительно ниже, чем в моновалентных, что делает их более перспективными для дальнейшего исследования.

Список источников

1. Huang J. et al. Worldwide burden, risk factors, and temporal trends of ovarian cancer: A global study // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14, № 9 – P. 2230.
2. Coward J.I.G., Middleton K., Murphy F. New perspectives on targeted therapy in ovarian cancer // *International Journal of Women's Health*. – 2015. – Vol. 7 – P. 189–203.
3. Шилова О.Н., Деев С.М. Дарпины-перспективные адресные белки для тераностики // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). – 2019. – Т. 11. – № 4 (43). – С. 42–53.
4. Kontermann R.E. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics // *Current opinion in biotechnology*. – 2011. – Vol. 22, № 6. – P. 868–876.
5. Emma von Witting, et al. Small bispecific affinity proteins for simultaneous target binding and albumin-associated half-life extension // *Molecular pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 18, № 1. – P. 328–337.
6. Vorobyeva A. et al. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of ^{99m}Tc-labeled DARPIn G3 // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 9405.

УДК 577.218

**Эффект повышенного уровня длинной некодирующей
РНК NEAT1_1 на клеточный стресс в первичных нейрональных культурах**

Н.Е. Пукаева^{1,2}, В.Н. Залевская¹, Р.К. Овчинников^{1,2}

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

¹Институт физиологически активных веществ,

Россия, г. Черноголовка, Северный проезд, 1, 142432

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Минздрава России,

Россия, г. Москва, Большая Пироговская ул., 9Ас1, 119435

E-mail: nadya.pukaeva@mail.ru

**Effect of elevated levels of long non-coding
RNA NEAT1_1 on cellular stress in primary neuronal cultures**

N.E. Pukaeva^{1,2}, V.N. Zalevskaya¹, R.K. Ovchinnikov^{1,2}

Scientific Supervisor: Ph.D., M.S. Kukharsky

¹Institute of Physiologically Active Compounds, Russia, Chernogolovka, Severny proezd, 1, 142432

²Pirogov Russian National Research Medical University, Russia, Moscow, Bolshaya Pirogovskaya
str., 9As1, 119435

E-mail: nadya.pukaeva@mail.ru

Abstract NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1) is a long non-coding RNA (lncRNA) of nuclear localization that plays an important role in the CNS and is involved in the development of pathological conditions of the nervous system. In this work, we evaluated the survival and apoptotic cell death of primary neuronal cell culture obtained from transgenic mice, expressing human NEAT1_1 under cellular stress conditions. As a result, we showed that depending on the type of stress, this lncRNA could play both a negative and a protective role. Disruption of protein homeostasis, as well as heat shock resulted in increase in the number of apoptotic cells in NEAT1_1 expressing cultures. Under replicative stress and oxidative stress, the number of apoptotic cells was significantly lower in NEAT1_1Tg cultures compared to the control ones. Transgenic primary neuronal cells demonstrated decreased expression of regulatory anti-apoptotic genes under ER stress, which exacerbated cell death, including neurons. However, NEAT1_1 specifically inhibited the aggregation of the TDP-43 protein, while it had no effect on the aggregation of the FUS protein.

Key words: long non-coding RNAs, NEAT1_1, cellular stress, primary neuronal cultures, apoptosis

Введение

Длинные некодирующие РНК (днРНК) – это молекулы длинной более 200 нуклеотидов не имеющие открытых рамок считывания [1]. днРНК принимают участие в развитии нервной системы, нейрональной пластичности, а также в патогенезе неврологических заболеваний [2]. днРНК, для которой убедительно показана связь с развитием патологических состояний нервной системы, является NEAT1 (от англ. Nuclear Enriched Abundant Transcript 1). Изменение её уровня в мозге наблюдается при ряде нейродегенеративных заболеваний и психических расстройств. NEAT1 участвует во взаимодействии с белками, патологическая агрегация которых в нервных клетках приводит к развитию нейродегенерации [3, 4]. При этом на клеточном уровне развивается стресс различной природы: стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР-стресс), оксидативный стресс и др. Влияние NEAT1 на молекулярные механизмы развития клеточного стресса, связанного с белковой агрегацией и клеточную гибель, остается не ясным [3, 5]. Целью данного исследования было охарактеризовать влияние повышенного уровня NEAT1_1 на выживаемость первичных гиппокампальных культур, полученных от трансгенных мышей NEAT1_1Tg, в условиях клеточного стресса.

Материалы и методы исследования

Первичные культуры получали из гиппокампов мышей на третий день после рождения. Клетки культивировались в среде Нейробазальная, с добавкой B27 (НейроМакс). Анализ проводили через 7 дней после посева. Проводилась характеристика клеточного состава культур методом иммуноцитохимии (ИЦХ). Морфологическую характеристику первичных нейронов проводили методом Sholl-анализа в программе ImageJ. Клетки подвергались действию факторов, вызывающих разные типы клеточного стресса: ЭПР-стресс (ингибитор протеасом MG132), репликативный стресс (камптотецин), температурный шок (нагрев до 44 °C), оксидативный стресс (NaAsO₂). Апоптотическую гибель клеток оценивали методом ИЦХ окрашивания антителами к активированной форме каспазы 3 (CC3), которая является маркером необратимой фазы апоптоза. Было проведено секвенирование транскриптомов (RNA-seq) клеток первичных культур, с последующей оценкой функционального значения дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) при ЭПР-стрессе. Анализ экспрессии генов сигнальных путей реализации клеточного ответа на стресс, а также генов апоптоза, осуществляли методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР).

Результаты

Характеристика первичных гиппокампальных культур, с помощью окраски на маркеры основных типов клеток, показала, что полученные первичные нейрональные культуры содержали около 9±1,3 % нейронов, 61±5,6 % астроцитов, 28±2,5 % олигодендроцитов и 2±0,5 % микроглиоцитов. При остром ЭПР-стрессе, вызванном обработкой культур высокой концентрацией MG132 (200 мкМ) выраженная гибель клеток детектировалась уже через 4 часа после обработки, при этом в культурах, полученных от трансгенных животных (NEAT1_1Tg) обнаруживалось значимо большее число клеток, гибнущих апоптозом в сравнении с культурами дикого типа (WT). Низкая концентрация MG132 (10 мкМ) приводила к развитию умеренного транзистентного ЭПР-стресса. В NEAT1_1Tg культурах в сравнении с WT, после стресса, количество апоптотических клеток было больше через 4 часа после обработки, и такая же тенденция сохранялась на 12 часах, тогда как на 24 часа разница нивелировалась. Для оценки того, как ЭПР-стресс влияет на выживаемость именно нейронов проводилась совместная окраска на CC3 и маркер дифференцированных нейронов NeuN, после чего подсчитывали клетки экспрессирующие оба этих маркера. Гибель нейронов была значимо выше в NEAT1_1Tg культурах. При моделировании теплового шока, в трансгенных культурах клеточная гибель была выражена сильнее. Через 12 часов после обработки клеток камптотецином (500 мкМ) в WT культурах наблюдалась тенденция на увеличение числа CC3-позитивных клеток, а через 24 часа разница становилась достоверной, в сравнении с NEAT1_1Tg культурами. При этом в трансгенных культурах, также, снижалось число гибнущих нейронов. Схожий эффект наблюдался после обработки клеточных культур арсенитом натрия (0,5 мМ), через 4 часа наблюдался тренд на снижения количества CC3+ клеток в трансгенных культурах, в то время, как через 12 часов различия достигали значимости. Далее проводилась серия экспериментов, в которых в трансгенных и контрольных первичных культурах была индуцирована патологическая белковая агрегация, путем трансфекции клеток генетическими конструктами, кодирующими мутантные укороченные формы белков TDP-43(Δ3-192) и FUS(ΔNLS), меченых флуоресцентным белком GFP. В трансгенных культурах было отмечено снижение уровня общей флуоресценции в культурах трансфецированных TDP-43(Δ3-192), что говорит об ингибировании его агрегации. Агрегация белка FUS(Δ360-526) была одинаково выражена в трансгенных и контрольных культурах.

Для выявления молекулярных мишеней на которые может влиять NEAT1_1 нами был проведен транскриптомный анализ трансгенных культур, обработанных 10 мкМ MG132, а также трансгенных культур без индукции стресса. Анализ функционального значения ДЭГ показал, что в трансгенных культурах при стрессе обогащены сигнальные пути, связанные

с ответом на присутствие несвернутых белков и путь mTORC1. Помимо этого в качестве обогащённой онтологии можно было выделить функцию связывания с РНК (база данных GO Molecular Function 2023). Среди биологических процессов (GO Biological Process 2023), обогащение наблюдалось в биогенезе рибосом и рибонуклепротеиновых комплексов. Среди охарактеризованных ДЭГ был выделен ряд генов, участников сигнальных путей реализации клеточного ответа на ЭПР-стресс и апоптоз, для оценки экспрессии методом ОТ-кПЦР. В результате было показано, что чрез 4 часа после обработки клеточных культур MG132 наблюдалось увеличение экспрессии генов ключевых участников сигнальных путей ответа на ЭПР-стресс: транскрипционных факторов *Atf4* и *Xbp1*, шаперона *Hspa5* (*Grp78*) и проапоптотического гена *Chop* (*Ddit3*). Аналогичные изменения экспрессии данных генов происходили и в трансгенных культурах после обработки MG132. Однако уровень экспрессии *Atf4* и *Ddit3* был значимо выше в стрессированных WT культурах. При запуске репликативного стресса в NEAT1_1Tg культурах происходило значимое повышение генов транскрипционных факторов (*Egr1*, *Fos*), играющих роль в активности и пластичности нейронов.

Заключение

Из приведенных результатов по влиянию NEAT1_1 на выживаемость нейрональных клеток можно сделать вывод, что в зависимости от типа стрессового воздействия данная днРНК может играть как негативную, так и протекторную роль. При нарушении белкового гомеостаза (стресс эндоплазматического ретикулума), а также в условиях температурного шока, наблюдалось увеличение числа апоптотических клеток в культурах, экспрессирующих NEAT1_1. Тогда как при репликативном стрессе (ингибировании топоизомеразы I) и оксидативном стрессе количество гибнущих клеток было значимо ниже в NEAT1_1Tg культурах в сравнении с контрольными. NEAT1_1 специфически ингибирует агрегацию белка TDP-43, тогда как на агрегацию белка FUS не влияет. Данный эксперимент подтверждает существующую гипотезу о том, что NEAT1_1 обладает протекторным свойством против токсичности, вызванной агрегацией белка TDP-43. Повышенный уровень NEAT1_1 в нейрональных культурах при развитии ЭПР-стресса приводил к снижению регуляторных антиапоптотических сигналов, что усиливает клеточную гибель, в том числе и нейронов. Таким образом повышение уровня данной РНК в нервной системе пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, при которых наблюдается белковая агрегация и развитие ЭПР-стресса может выступать как патогенетический фактор. Направленное изменение количества данной РНК в клетке может рассматриваться как потенциальный способ повышения выживаемости нервных клеток при развитии патологических изменений, приводящих к клеточному стрессу и апоптотической гибели.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИФАВ РАН (тема № FFSG-2024-0021).

Список источников

1. Kopp F. and Mendell J.T. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs // *Cell*. – 2018. – V. 172 (3). – P. 393–407.
2. Wan P., Su W., and Zhuo Y., The Role of Long Noncoding RNAs in Neurodegenerative Diseases // *Mol Neurobiol*. – 2017. – V. 54 (3). – P. 2012–2021.
3. Matsukawa K., et al., Long non-coding RNA NEAT1_1 ameliorates TDP-43 toxicity in in vivo models of TDP-43 proteinopathy // *RNA Biol*. – 2021. – V. 18 (11). – P. 1546–1554.
4. Nishimoto Y., et al., The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis // *Mol Brain*. – 2013. – V. 6. – P. 31.
5. Shelkovnikova T.A., et al., Protective paraspeckle hyper-assembly downstream of TDP-43 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis // *Mol Neurodegener*. – 2018. – V. 13 (1). – P. 30.

УДК 620.3

Модификация пористой керамики для улучшения адгезии клетокЕ.И. Сенькина^{1,2}, А.С. Буяков^{1,2}

Научный руководитель: к.ф.-м.н., А.С. Буяков

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет
Россия, Томск, пр. Ленина, 36, 634050,²Институт физики прочности и материаловедения СО РАН,
Россия, Томск, Академический пр., 2/4, 634055E-mail: elena.senkina.1995@mail.ru**Modification of porous ceramics to improve cell adhesion**E.I. Senkina^{1,2}, A.S. Buyakov^{1,2}

Scientific Supervisor: Ph.D., A.S. Buyakov

¹Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050²Institute of Strength Physics and Materials Science, Russia, Tomsk, Akademicheskii str., 2/4, 634055E-mail: elena.senkina.1995@mail.ru

Abstract. *This work demonstrates the modification of porous zirconia ceramics with boehmite nanosheet structures to improve cell adhesion by impregnating the samples in an alcohol suspension of Al nanopowder and then oxidizing the rooted particles in the porous matrix. According to the in vitro results, cells cultured on the modified samples showed higher engraftment rates compared to the control group. Formation of boehmite nanostructures leads to an increase in specific surface area, which favors better cell adhesion.*

Key words: *bioceramics, modification, adhesion, cell proliferation*

Введение

Одной из актуальных современных проблем науки о материалах является развитие технологий создания структурно-функциональных заменителей поврежденных тканей. На данном этапе одним из решений является подход, основанный на изготовлении тканеинженерных конструкций, представляющих собой клетки, посаженные на скаффолды [1]. В области тканевой инженерии и регенеративной медицины большое значение имеют исследования клеточной адгезии, а также всестороннее понимание взаимодействия клеток с субстратом [2]. Некоторые материалы, используемые в имплантологии, имеют ограниченное использование в связи с низкими адгезивными свойствами, например, циркониевая керамика [3]. Обладая высокими физико-механическими характеристиками, стойкостью к изнашиванию и биосовместимостью, керамика на сегодняшний день используется в основном лишь в стоматологии и для замены суставов. Варьирование прочности и увеличение адгезивных свойств будет способствовать расширению спектра применения керамических имплантатов.

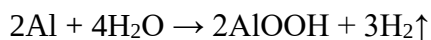
Цель работы – улучшение адгезивных свойств керамики путем формирования нанолистовых структур бемита в объеме пористой матрицы.

Материалы и методы исследования

Исходные порошковые составы исследуемых пористых керамик были подготовлены путем механического смешивания порошка $ZrO_2(Y_2O_3)$ (Tosoh, Japan) с разными порообразующими частицами: канифоль (*irregular*) со средним размером частиц 400 мкм, сверхвысокомолекулярный полиэтилен (*spherical*) со средним размером частиц 60, 150 и 300 мкм. Содержание частиц составляло 50 об. % от общего объема смеси. Одноосное холодное прессование осуществлялось в стальной пресс-форме при давлении 130 МПа. Удаление порообразующих частиц осуществлялось путем отжига компактов в воздушной

печи при температуре 1100 °С с выдержкой 1 час, спекание - при температуре 1500 °С, скорости нагрева 200 °С/час и с выдержкой в 1 час.

Модификацию макропористой керамики осуществляли путем пропитки образцов в 1 масс. % суспензии нанопорошка Al в этиловом спирте и последующим окислением водой закрепившихся наночастиц при температуре 60 °С по реакции:



Для изучения влияния модификации керамики наночастицами на адгезию клеток проводили МТТ-тест. Культивирование клеток осуществляли методом прямого контакта на поверхности керамики. В качестве контроля выступали пустые лунки 24-луночного планшета. В исследовании использовали фибробласты мыши линии 3Т3. Культивирование проходило 24 часа в полной питательной среде DMEM/F-12 в инкубаторе Sanyo MCO-5AC (Sanyo, Япония) с температурой 37 °С и с подачей 5 % CO₂. Далее определяли оптическую плотность на планшетном фотометре Multiscan FC (Termo Scientific, Германия).

Результаты

На рисунке 1 представлены снимки образцов после пропитки наночастицами Al, но до их окисления. Видно, что в зависимости от размера частиц используемых порообразователей меняется проницаемость скаффолдов.

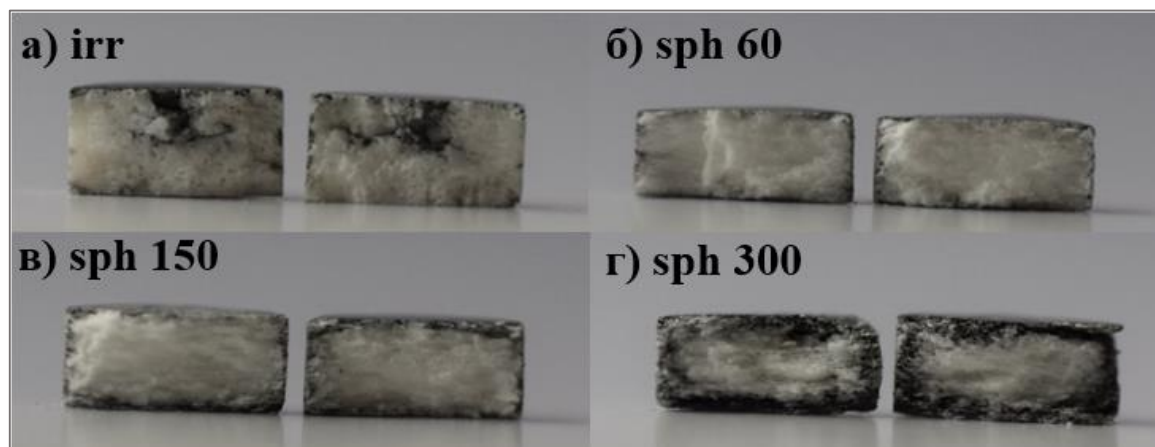


Рис. 1. Пористая керамика после пропитки наночастицами Al

На рисунке 2 представлены СЭМ изображения керамики до и после образования нанолayers структур бемита. Здесь наблюдается, что после модификации прежде гладкие зерна обрели «шершавость».

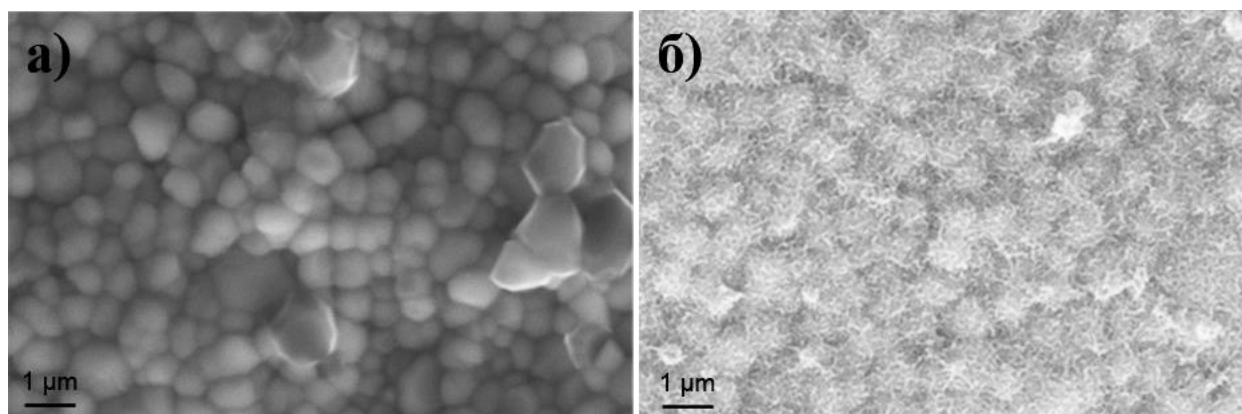


Рис. 2. СЭМ изображения керамики а) до и б) после модификации

Согласно проведенному МТТ-тесту, было установлено, что после модификации пористой керамики на ее поверхности адгезируется больше клеток на 10–20 % (рис. 3). В случае с sph 300 результаты были противоположными, модификация снизила адгезивные свойства керамики. Это может быть связано с большей впитывающей способностью sph 300, из-за которой клетки адгезируются во внутреннее пористое пространство, где их жизнеспособность ниже, чем на поверхности образцов.

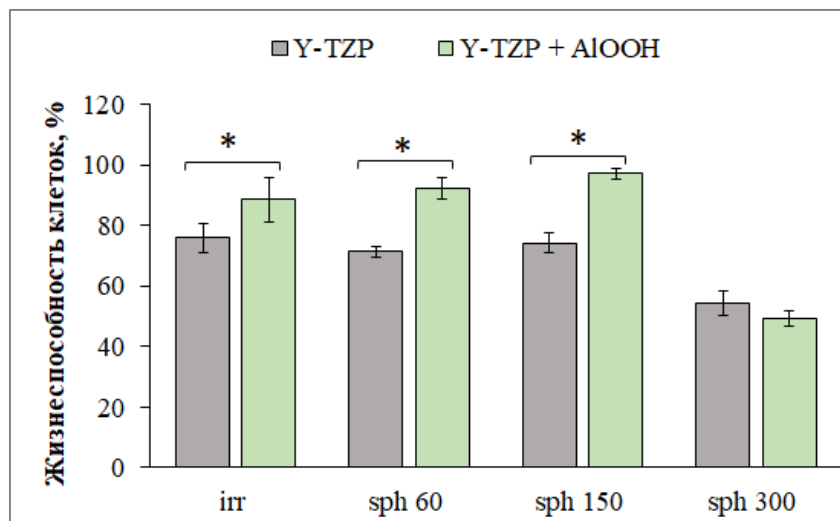


Рис. 3. Жизнеспособность клеток линии 3T3, инкубированных на поверхности циркониевой керамики до и после модификации.

* – статистически значимые различия при $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля

Достоверность разницы оптической плотности клеток в опытных лунках по сравнению с контрольными определяли по U-критерию Манна-Уитни, достоверное различие принято при $p < 0,01$.

Заключение

В ходе исследования было обнаружено, что модификация пористой циркониевой керамики наноструктурами бемита приводит к увеличению удельной площади поверхности. Также эксперименты *in vitro* показали, что сформированная наночастицами морфология поверхности оказалась более благоприятной для прикрепления клеток. В сравнении с контрольной группой на модифицированной керамике клеток адгезировалось на 10–20 % больше.

Работы выполнены в рамках государственного задания ИФПМ СО РАН, тема номер FWRW-2022-0002 и Плана НИИР Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра на 2020-2024 г., тема Эколан М-1.9.

Список литературы

1. Gerberich B. G., Bhatia S. K. Tissue scaffold surface patterning for clinical applications // *Biotechnology Journal* – 2013. – Vol. 8. – P. 73–84.
2. Cai S., Wu C., Yang W., Liang W., Yu H., Liu L. Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors // *Nanotechnology Reviews*. – 2020. – Vol. 9, № 1. – P. 971–989.
3. Silva A.D.R., Pallone E.M.J.A., Lobo A.O. Modification of surfaces of alumina-zirconia porous ceramics with Sr^{2+} after SBF // *Journal of the Australian Ceramic Society*. – 2019. – Vol. 56. – P. 517–524.

УДК 616-005.8 + 615.22

**Кардиопротекторный эффект агонистов каннабиноидных рецепторов
при реперфузии сердца**

М. Сиротина

Научный руководитель: профессор, д.м.н. Л.Н. Маслов
Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный
исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
Россия, г. Томск, ул. Киевская, 111 а, 634012
E-mail: sirotina_maria@mail.ru

The cardioprotective effect of cannabinoid receptor agonists in reperfusion of the heart

M. Sirotina

Scientific Supervisor: Prof., Ph.D, L.N. Maslov
Cardiology Research Institute, Russia, Tomsk, Kievskaya str., 111 a, 634012
E-mail: sirotina_maria@mail.ru

Abstract. *Ischemic and reperfusion injury of the heart plays a key role in the pathogenesis of acute myocardial infarction. Percutaneous coronary intervention reduces in-hospital mortality from AMI to 7 %. In-hospital mortality in patients with myocardial infarction is not reduced in recent years. The cause is the lack of highly effective drugs that can prevent cardiac reperfusion injury in clinical practice. Our preliminary data indicate that similar drugs can be created on the basis of cannabinoids. The study was performed on Wistar rats. The rats underwent coronary artery occlusion (45 min) and reperfusion (120 min) then myocardial sections were prepared and stained. The planimetric method was used to evaluate the infarct size/area at risk ratio. It was shown that administration of cannabinoid receptor agonists can reduce infarct size. Thus, it could be concluded that cannabinoid receptor agonists HU-210, JWH133 and HU-910 are able to prevent cardiac reperfusion injury.*

Key words: heart, ischemia-reperfusion, cannabinoid receptor

Введение

Ишемическое и реперфузионное повреждение сердца лежит в основе патогенеза острого инфаркта миокарда. В настоящее время, смертность среди пациентов с острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST составляет около 7 % [1]. Одной из причин такой летальности является отсутствие в клинической практике лекарственных препаратов, способных эффективно защитить миокард от реперфузионных повреждений [2], поэтому остается актуальным поиск и разработка лекарственных препаратов, предупреждающих реперфузионные повреждения сердца.

В качестве перспективной основы для разработки таких лекарственных препаратов выступает феномен дистантного посткондиционирования (ДПост) – при его моделировании наблюдается кардиопротекция за счет воздействия кратковременной ишемии/реперфузии другого (дистантного) органа во время реперфузии сердца [3]. В реализации эффекта ДПост важную роль играют Gi/o-белок сопряжённые рецепторы, которым относятся аденозиновые, опиоидные, а также каннабиноидные рецепторы.

Нами получены данные о том, что при моделировании ДПост содержание эндоканнабиноидов увеличивается в сыворотке крови и миокарде у крыс (неопубликованные данные). В ряде исследований продемонстрирован инфаркт-лимитирующий эффект каннабиноидов [4, 5]. Однако роль отдельных субтипов каннабиноидных рецепторов в повышении толерантности сердца к реперфузии, до сих пор не изучена.

Цель работы выяснить, способны ли агонисты каннабиноидных СВ рецепторов предупреждать реперфузионное повреждение сердца.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 86 самках крыс Wistar массой 250–300 г. Всех животных подвергали 45-минутной коронароокклюзии и 120-минутной реперфузии [6]. Для моделирования коронароокклюзии крыс наркотизировали внутрибрюшинным введением α -хлоралозы (50 мг/кг) и подключали к аппарату искусственной вентиляции легких «SAR-830 Series».

Выявляли зону некроза (ЗН) и зону риска (ЗР, зона гипоперфузии). Зона некроза выделялась из области риска путем окрашивания 1 % раствором 2,3,5-трифенилтетразолияхлорида (30 минут, 37 °C), являющегося индикатором жизнеспособных клеток и тканей. Размер зоны риска и зоны некроза определяли компьютеризированным планиметрическим методом. Размер ЗН выражали в процентах от размера зоны гипоперфузии (зона риска), как соотношение ЗН/ЗР.

В работе использовали: агонист каннабиноидных CB1 и CB2 рецепторов HU-210 (1 мг/кг), агонисты каннабиноидных CB2 рецепторов JWH133 (3 мг/кг) и HU-910 (3 мг/кг), антагонист каннабиноидных CB1 рецепторов римонабант (1 мг/кг). Антагонист рецепторов вводили внутривенно за 10 мин до реперфузии, агонисты – за 5 мин до реперфузии.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA 13.0. (StatSoft, Inc., США). Результаты всех экспериментов приведены в таблицах и на диаграммах в виде $M \pm SD$ (где M – среднее, SD – стандартное отклонение), n – объем анализируемой группы. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Для выявления субтипов каннабиноидных CB рецепторов, участвующих в инфаркт-лимитирующем эффекте каннабиноидов крысам вводили агонист каннабиноидных CB1 и CB2 рецепторов HU-210. В контрольной группе отношение ЗН/ЗР составляло $42,9 \pm 2,3$ %. Как показано на рисунке 1, после его внутривенного введения было выявлено достоверное уменьшение соотношения ЗН/ЗР в 2,5 раза по сравнению с контрольными животными.

Для изучения роли CB1 рецепторов в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта HU-210, животным вводили селективный антагонист каннабиноидных CB1 рецепторов – римонабант. Внутривенное введение римонабанта не устраняло инфаркт-лимитирующий эффект HU-210. Эти данные позволяют предположить, что инфаркт-лимитирующий эффект HU-210 реализуется за счет активации каннабиноидных CB2 рецепторов. Эта гипотеза требует дальнейшего подтверждения.

После внутривенного введения агониста каннабиноидных CB2 рецепторов JWH133 было выявлено достоверное уменьшение индекса ЗН/ЗР в 2 раза по сравнению с контрольными животными. При использовании агониста каннабиноидных CB2 рецепторов HU-910 также было зафиксировано статистически значимое снижение соотношения ЗН/ЗР.

Полученные данные свидетельствуют о том, что агонисты каннабиноидных рецепторов 2 типа участвуют в инфаркт-лимитирующем эффекте.

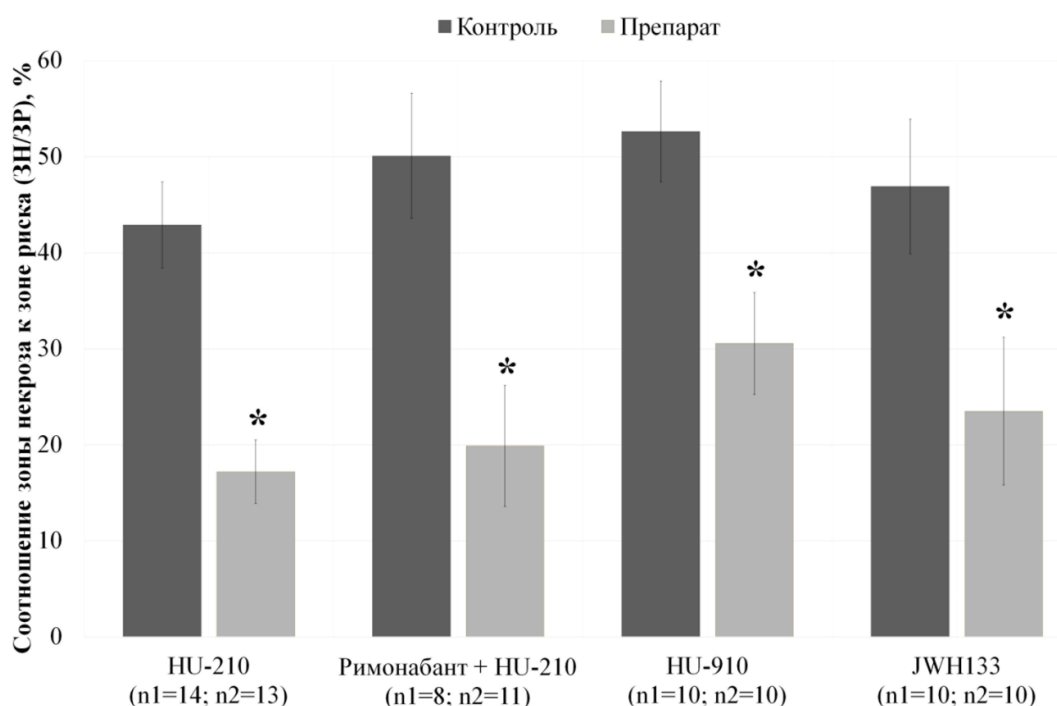


Рис. 1. Размер зоны некроза/зона риска при 45-минутной коронароокклюзии и 120-минутной реперфузии у крыс ($M \pm SD$). Примечание: * – значимые отличия по сравнению с группой контроля при $p < 0,05$; n1 – количество крыс в группе контроля; n2 – количество крыс в группе с препаратом

Заключение

Установлено, что агонисты каннабиноидных СВ рецепторов HU-210, JWH133 и HU-910 способны предупреждать реперфузионное повреждение сердца. В свою очередь механизм реализации данного эффекта еще не изучен.

Автор выражает признательность д.м.н. Маслову Л.Н. за консультативную помощь при планировании исследования, Цибульникову С.Ю. и Курбатову Б.К. за техническую помощь.

Список литературы

1. Jollis J.G., Granger C.B., Zègre-Hemsey J.K. et al. Treatment time and in-hospital mortality among patients with ST-segment elevation myocardial infarction, 2018–2021 // *Jama*. – 2022. – V. 328, № 20. – P. 2033–2040.
2. Маслов Л.Н., Барбараш О. Фармакологические подходы к ограничению размера инфаркта у пациентов с острым инфарктом миокарда. Анализ клинических данных // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2018. – Т. 81, № 3. – С. 34–41.
3. de Miranda D.C., de Oliveira Faria G., Hermidorff M.M. et al. Pre-and post-conditioning of the heart: an overview of cardioprotective signaling pathways // *Current Vascular Pharmacology*. – 2021. – V. 19, № 5. – P. 499–524.
4. Hillard C.J. Circulating endocannabinoids: from whence do they come and where are they going? // *Neuropsychopharmacology*. – 2018. – V. 43, № 1. – P. 155–172.
5. Lee D.I., Murninkas M., Elyagon S. et al. Cannabinoid receptor agonist inhibits atrial electrical remodeling in a tachypaced Ex Vivo rat model // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. – V. 12. – P. 642398.
6. Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J. Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (δ)-opioid receptor in the intact rat heart // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 1997. – V. 29, № 8. – P. 2187–2195.

УДК 615.015.21

**Влияние полисахаридсодержащего комплекса из корней лопуха войлочного
(*Arctium tomentosum* Mill.) на развитие карциномы легких Льюис
у мышей-самок линии C57Bl/6**

Л.А. Соколова¹, О.Ю. Рыбалкина¹, Л.В. Жалнина²

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

¹Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины
имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634028

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

E-mail: sokolova.lyubov99@mail.ru

**Effect of a polysaccharide containing complex from the roots of burdock
(*Arctium tomentosum* Mill.) on the development of Lewis lung carcinoma
in female C57Bl/6 mice**

L.A. Sokolova¹, O.Yu. Rybalkina¹, L.V. Zhalnina²

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

¹Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Russia, Tomsk, Lenin str., 3, 634028

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

E-mail: sokolova.lyubov99@mail.ru

Abstract. The present study obtained data on the effect of an aqueous extract containing water-soluble polysaccharides from the roots of burdock (*Arctium tomentosum* Mill.) on the development of Lewis lung carcinoma in female C57Bl/6 mice and the effectiveness of treatment with cyclophosphamide. It was shown that extract, when administered in an isolated course at doses of 20 mg/kg and 50 mg/kg, does not affect the development of the tumor process. However, the extract at a dose of 50 mg/kg enhances the antitumor activity of cyclophosphamide: the average tumor weight decreased by 35 % compared to animals treated with cyclophosphamide alone ($p < 0.05$). The data obtained indicate the prospects of further studying of effect an extract containing water-soluble polysaccharides from burdock roots (*Arctium tomentosum* Mill.) of different tumors in vivo and in vitro.

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

Введение

Онкопатология по-прежнему является одной из ведущих причин смертности населения во всем мире. Стандартные методы лечения злокачественных новообразований, включая лучевую и химиотерапию, имеют ограниченную эффективность и нередко вызывают побочные эффекты, значительно снижающие качество жизни пациентов. В связи с этим, является актуальным поиск и разработка средств, способных снижать токсическое влияние химиотерапевтических препаратов на здоровые ткани и органы, а также не снижающих эффективность лечения. Особое внимание привлекают растительные полисахариды, обладающие высокой биологической активностью и являющиеся перспективным источником получения новых фармакологически активных веществ.

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

Цитотоксическая активность экстракта из *A. tomentosum* показана в экспериментах *in vitro* на клеточных опухолевых линиях человека HeLa, MCF7, A431 [5]. В эксперименте на модели свинцово-уксусной анемии у крыс были получены данные о стимулирующем влиянии водорастворимых полисахаридов лопуха большого на процессы эритропоэза и иммунопоэза [6].

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

Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнен на 60 половозрелых мышах-самках линии C57Bl/6 массой 20–21 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария на обычном рационе питания со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры выполнялись в соответствии с международными правилами и нормами [7].

Суммарный водный экстракт из корней лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.), содержащий полисахаридный комплекс (ПСК) в качестве мажорного компонента (24,8 %), изготовлен на кафедре фармацевтического анализа СибГМУ. Оценку влияния экстракта на развитие перевиваемой опухоли проводили на экспериментальной модели карциномы легких Льюис (LLC) у мышей. Трансплантацию опухоли осуществляли взвесью опухолевых клеток ($4-5 \times 10^6$ клеток в 0,1 мл физиологического раствора) в мышцу левой задней лапы животного-реципиента. ПСК из корней лопуха войлочного вводили мышам внутривентрально в дозах 20 мг/кг и 50 мг/кг в течение 9 дней, начиная с 7 сут после перевивки опухоли.

В качестве химиотерапевтического препарата использовали циклофосфан (ЦФ) (эндоксан, серия 9Н326А, ЗАО компания «Бакстер», Россия) в дозе 125 мг/кг, который вводили однократно внутривентрально в 0,1 мл физиологического раствора на 10 сут после трансплантации опухоли.

По окончании эксперимента (17 сут) оценивали эффективность применяемых лечебных воздействий по противоопухолевому и противометастатическому действию препаратов: определяли массу опухоли, процент торможения ее роста (ТРО), количество метастазов в легких и их площадь, частоту метастазирования, индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) [8].

Статистическая обработка первичных данных производилась путем расчета средней ($\bar{X}$) и стандартной ошибки (m) с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни (U). Для выявления достоверности различий качественных показателей использовался критерий углового преобразования Фишера (ф). Различия считали достоверными при $P < 0,05$ [9].

Результаты

Изолированное применение ПСК из корней лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.) в дозах 20 мг/кг и 50 мг/кг не влияло на развитие у мышей карциномы легких Льюис.

Однократное введение ЦФ в дозе 125 мг/кг на 10 сут эксперимента животным с карциномой легких Льюис существенно ингибировало рост опухоли у мышей: достоверно снизилась средняя масса опухоли (ТРО = 24,7 %), среднее количество метастазов (в 11,9 раз) и их площадь (в 19 раз) ($P < 0,01$). В группе мышей, леченных ЦФ, достоверно снизилась и частота метастазирования (40 % против 100 % в контроле; $P < 0,01$). Индекс ингибирования метастазирования составил 96,6 %.

Введение в схему химиотерапии ПСК из корней лопуха войлочного в дозе 50 мг/кг вызвало повышение антибластомной активности циклофосфана: средняя масса опухоли у животных с LLC достоверно снизилась на 51,1 % относительно группы контроля ($2,02 \pm 0,2$ г против $3,11 \pm 0,38$ г в группе контроля; $P < 0,05$). В тоже время, ПСК из корней лопуха войлочного в меньшей дозе (20 мг/кг) не повлиял на эффективность цитостатического лечения.

В отношении процесса метастазирования опухоли применение на фоне лечения ЦФ экстракта, содержащего ПСК из корней лопуха войлочного в дозах 20 мг/кг и 50 мг/кг не вызывало достоверных изменений данных показателей. Однако, наблюдалась тенденция к уменьшению среднего количества метастатических узлов в легких и их площади по сравнению с показателями у мышей, леченных только ЦФ.

Заключение

Таким образом, в эксперименте на мышах с карциномой легких Льюис обнаружено, что полисахаридсодержащий экстракт из корней лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill.) в дозе 50 мг/кг при его комбинированном применении усиливает антибластомное действие циклофосфана. В отношении процесса метастазирования опухоли применение на фоне цитостатического лечения экстракта, содержащего водорастворимые полисахариды из корней лопуха войлочного в дозах 20 мг/кг и 50 мг/кг, не оказало значимого влияния.

Список литературы

1. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том 4 // Федеральная электронная медицинская библиотека: сайт. – 2018. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения 07.03.2024)
2. Жданов В.Н. Влияние извлечений из лопуха войлочного на токсические эффекты этанола и гипоксию: автореф. дисс. канд. биол. наук / В. Н. Жданов. – Томск, 1999. – 20 с.
3. Вымятина З.К. Влияние экстракта из семян *Arctium tomentosum* Mill. на функциональное состояние желудка у собак и тонкого кишечника у крыс // Растит. ресурсы. – 2000. – Т. 36, № 3. – С. 59–64.
4. Поветьева Т.Н., Пашинский В.Г., Дудко В.В. Противовоспалительные свойства сухих экстрактов из корней и листьев *Arctium tomentosum* Mill. // Растит. ресурсы. – 2001. – № 2. – С. 80–85.
5. Csupor-Löffler B., Hajdu Z., Rethy B. et al. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cells lines. Part II // J. Phytother. Res. – 2009. – Vol. 23. – P. 1109–1115.
6. Кокина Д.Г. Сычев И.А. Действие полисахарида листьев лопуха большого на эритропоз в условиях железодефицитной анемии // Современные проблемы науки и образования. – 2022. – № 5. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=32048> (дата обращения: 07.03.2024).
7. Директива Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях от 2010 г. № 2010/63/EU. Санкт-Петербург: НП «Объединение специалистов по работе с лабораторными животными», 2012.
8. Софьина З.П., Сыркин А.Б., Голдин А., Кляйн А. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. – М. : Медицина, 1980. – 296 с.
9. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л. : Медицина, 1978. – 296 с.

УДК: 615.035

**Эффективность антиоксидантов разных типов в экспериментальной модели
ДНК-повреждений клеток тестикулярной ткани**

Л.А. Стремлина

Научный руководитель: профессор, д.б.н., Т.Г. Боровская

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 3, 634028

E-mail: repropharm@yandex.ru

**Efficiency of different types of antioxidants in an experimental model
of DNA damage in testicular tissue cells**

L.A. Stremlina

Scientific Supervisor: Prof., Dr., T.G. Borovskaya

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Russia, Tomsk, Lenin str., 3, 634028

E-mail: repropharm@yandex.ru

Abstract. *One of the most significant reproductive health problems is infertility. It has been established that the cause of infertility in 50% of cases is the male factor. The main treatment strategy today is antioxidant therapy aimed at reducing the state of oxidative stress. For this reason, the search for the most optimal antioxidant is relevant. The work assessed the effect of antioxidants from different chemical classes on the redox balance of rats testicular tissue cells and the level of DNA damage in them. The level of DNA damage was determined by the Comet assay, the redox balance was estimated by chemiluminescence. The phenolic compound (dibornol) was more effective, contributed to the normalization on the redox balance. The vitamin B6 derivate demonstrated its antiradical activity only.*

Key words: *sperm DNA damage, antioxidants, redox balance*

Введение

Одной из наиболее значимых проблем репродуктивного здоровья является бесплодие. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), от бесплодия страдает около 17,5 % взрослого населения. Установлено, что причиной бесплодия в 50 % случаев выступает мужской фактор [1]. Всё большее количество специалистов-репродуктологов связывают мужскую инфертильность с высоким уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов [2]. Несмотря на существенный вклад, вносимый методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), в решение проблемы, многие из них остаются недоступными для широкого круга лиц. Основной стратегией лечения мужской инфертильности является применение антиоксидантной терапии, нацеленной на снижение уровня окислительного стресса в мужских половых клетках. Однако, по данным Кокрейновского обзора, эффективность используемых соединений не превышает 10 % [3]. Таким образом, поиск терапии, учитывающей специфику окислительно-восстановительных реакций клеток тестикулярной ткани, и наиболее оптимального антиоксиданта являются актуальными вопросами фармакологии репродуктивной системы.

В качестве антиоксидантных воздействий в настоящем исследовании использовали мексидол (МД, производное витамина В6) и диборнол (ДБ, класс пространственно затрудненных фенолов). Выбор препарата МД обусловлен тем, что для него выявлен положительный эффект, оказываемый на фертилизующие свойства мужских половых клеток [4]. Данные экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что ДБ улучшает качество показателей спермограммы крыс [5].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния лечебно-профилактического курса антиоксидантов различных химических классов на

уровень ДНК-повреждений клеток тестикулярной ткани крыс, вызванных инъекцией цитостатического препарата, а также на их окислительно-восстановительный баланс.

Экспериментальная часть

Объектом исследования были половозрелые (2,5 мес) крысы самцы ($n = 20$) стока SD массой 250–300 г. Условия содержания и манипуляции с животными соответствовали стандартам, указанными в нормативных документах, регламентирующих работу с лабораторными животными. Животные находились на стандартном рационе (корм ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия) со свободным доступом к пище и воде. В качестве препарата, моделирующего патологический процесс, использовали паклитаксел. Животные были распределены на 4 группы: животные группы 1 — фон (интактные животные); животные группы 2 получали цитостатический препарат паклитаксел (митотакс, «Dr. Reddy's», Индия) в дозе 7,6 мг/кг (максимально переносимая доза) однократно в хвостовую вену. Животным группы 3 был на фоне паклитаксела был введен препарат сравнения — этилметилгидроксипиридина сукцинат (мексидол, ЗАО «ЗиО-Здоровье», Россия,) внутривентриально в дозе 50,0 мг/кг. Животные 4 группы получали диборнол (антиоксидант класса фенольных соединений) внутривентриально в дозе 10,0 мг/кг на фоне введения паклитаксела. Диборнол и мексидол вводили в режиме 5 дней до и 5 дней после инъекции цитостатического препарата. Животных эвтаназировали в атмосфере CO_2 через 3 месяца после начала эксперимента.

Для определения уровня ДНК-повреждений тестикулярной ткани использовали метод ДНК-комет. Прооксидантную активность ткани (Про) определяли с помощью, усиленной люминолом спонтанной хемилюминесценции, уровень антиоксидантной защиты ткани (АОЗ) — индуцированной железом хемилюминесценцией. На основании их определения подсчитывали коэффициент ОВБ (окислительно-восстановительного баланса), который вычисляли как отношение уровня антиоксидантной защиты к прооксидантной активности.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Для представления количественных показателей в таблицах вычисляли среднее значение ($\bar{X}$) и стандартное отклонение (m). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

У крыс, получавших паклитаксел, количество повреждённой ДНК вдвое превысило таковое у интактных. Уровень светосуммы свободных радикалов, характеризующий прооксидантную активность, возрос на 63 %. Уровень антиоксидантной защиты снизился до 22,5 % от фона. Значение ОВБ уменьшилось в 6,7 раза (здесь и далее — таблица). Это свидетельствует о смещении окислительно-восстановительного баланса в сторону окислительных реакций и развитии состояния окислительного стресса. Полученные результаты подтверждают данные других авторов о том, что окислительный стресс является основным механизмом, индуцирующим ДНК-повреждения в клетках тестикулярной ткани [2].

При сравнении числа ДНК-разрывов в группе животных, получавших мексидол, с контролем статистически значимых различий выявлено не было. При введении данного препарата прооксидантная активность клеток тестикулярной ткани статистически значимо снизилась. Мексидол не оказывал влияния на уровни антиоксидантной защиты и окислительно-восстановительного баланса.

В группе крыс, получавших диборнол и паклитаксел, процент ДНК-повреждений и уровень продукции свободных радикалов были существенно ниже ($p \leq 0,05$), чем в контрольной группе. Уровень антиоксидантной защиты тестикулярной ткани возрос в 4 раза. Введение диборнола способствовало нормализации окислительно-восстановительного

баланса. Коэффициент ОББ возрос в 6,7 раза. Его средние значения не отличались от таковых у интактных животных.

Таблица 1

Фармакологический эффект и антиоксидантная активность диборнола и мексидола

Показатель	% ДНК в хвосте	ОББ·10 ⁻²	Про, RLU·10 ¹³ /с/г ткани	АОЗ, RLU·10 ¹¹ /с/г ткани
Фон	1,20±0,18	0,40±0,14	5,78±0,44	2,13±0,69
Контроль	2,42±0,67#	0,06±0,02#	9,47±1,23#	0,48±0,14#
Мексидол	1,42±0,27	0,05±0,02#	6,78±0,98*	0,31±0,10#
Диборнол	1,38±0,11*	0,40±0,15*	5,33±0,64*	1,82±0,48*

– различия достоверны по сравнению с фоном при $p \leq 0,05$; * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$

Полученные в настоящей работе экспериментальные данные позволяют предположить, что низкая эффективность антиоксидантной терапии у пациентов с повреждениями ДНК сперматозоидов может быть результатом нерационального выбора препарата. Выбор антиоксидантного воздействия должен быть основан на его способности нормализовать ОББ мужских половых клеток. Таким образом, определение ОББ является, по-видимому, предиктом успешной терапии.

Заключение

Фенольный антиоксидант диборнол обладает высокой фармакологической эффективностью в модели ДНК-повреждений клеток тестикулярной ткани. Эта эффективность сопровождается нормализацией ОББ клеток. Производное витамина В6 мексидол оказался неэффективным средством терапии данной патологии. Его введение сопровождалось антирадикальной активностью, но система антиоксидантной защиты клеток тестикулярной ткани оказалась невосприимчивой к действию препарата. Мексидол не приводил к нормализации ОББ и уменьшению числа ДНК-повреждений.

Список источников

1. Bisht S. Oxidative stress and male infertility // Nature Reviews Urology. – 2017. – Vol. 14, Is. 8. – P. 470–485.
2. Selvam M.K.P., Ambar R.F., Agarwal A., Henkel R. Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility // Andrologia. – 2021. – Vol. 53, Is. 1. doi: 10.1111/and.13706. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32559347.
3. de Ligny W., Smits R.M., Mackenzie-Proctor R. et al. Antioxidants for male subfertility // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2022. – Vol. 5, Is. 5. doi: 10.1002/14651858.CD007411.pub5. PMID: 35506389; PMCID: PMC9066298.
4. Евдокимов В.В., Жуков О.Б., Кастрикин Ю.В. и др. Оксидативный стресс и патозооспермия // Андрология и генитальная хирургия. – 2017. – Т. 18, № 2. – С. 27–32. DOI:10.17650/2070-9781-2017-18-2-27-32.
5. Боровская Т.Г., Камалова С.И., Кривова Н.А. и др. Экспериментальное изучение фенольных антиоксидантов при мужской инфертильности, обусловленной патоспермией // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 166, № 7. – С.10–13.

Study of antioxidant activity of the *Rosa acicularis*E.V. Tomtosova, E.K. Rummyantsev

Scientific Supervisor: PhD., V.M. Nikolaev

Yakut science centre of complex medical problems, Russia, Yakutsk, Yaroslavsky str., 6/3, 677000

E-mail: ytomtsova@mail.ru

Abstract. *This work investigated extracts of leaves, fruits, and seeds of Rosa acicularis Lindley obtained by ultrasonic extraction. The antioxidant activity of the aqueous extracts was evaluated using a biological system model. The aqueous extracts' quantitative content of ascorbic and gallic acids was investigated using the HPLC method. The results of the study showed that the extracts of fruits of R. acicularis indicated the highest antioxidant activity compared to seed and leaf extracts. The highest antioxidant activity of fruit extracts is due to the high content of ascorbic and gallic acids.*

Key words: *Ultrasonic extraction, aqueous extracts, antioxidant activity*

Introduction

Excess of reactive oxygen species in the cell leads to intensification of free-radical oxidation, which is the initiator of damage to macromolecules and cell membranes, causing cell death and the development of oxidative stress in the body [1]. In living organisms, a system inhibits free-radical processes, an antioxidant defense. Insufficiency of this defense leads to the development of oxidative stress. Oxidative stress is the main cause of many diseases [2, 3]. Plants contain biologically active substances with antioxidant properties [4].

Prickly wild rose (*Rosa acicularis* Lindley) is a perennial shrub of the Rosaceae family. It grows in mixed and coniferous forests, on slopes, and in river valleys. It is distributed in Europe, North America, and temperate climates of Asia. *R. acicularis* contains a large number of biologically active substances (non-phenolic compounds: ascorbic acid, carotenoids, polysaccharides, different acids and lipids; phenolic compounds: flavonols, dihydroflavonols, catechins, hydroxycinnamates, proanthocyanidins, anthocyanins, ellagitannins, gallotannins), many of which have antioxidant properties [5].

R. acicularis is a pharmacopoeial plant whose fruits are predominantly used for food. Tea, jams, and syrups are prepared from its fruits. In traditional medicine, decoctions of *R. acicularis* fruits are used for gastrointestinal and cardiovascular problems [6, 7].

According to the results of studies by Shanina et al. (2003), it was shown that the entire vegetative part of the plant is a rich source of biologically active substances. In connection with the above, the antioxidant properties of leaf, fruit, and seed extracts of *Rosa acicularis* Lindley were studied in this work.

Research methods

Plant raw materials were collected in the autumn period in Yakutia. The ultrasonic extraction method was used to obtain aqueous extracts of leaves, fruits, and seeds of *R. acicularis* with a concentration of 0.33 mg/mL. Extraction was carried out at a frequency of 40 kHz and a temperature of 60 °C.

The antioxidant activity of the obtained extracts was studied in a model system of yolk lipoproteins. Lipid peroxidation was induced using ferrous sulfate. The antioxidant activity of the extracts was determined by the ability of thiobarbituric acid to interact with lipid peroxidation products to form a colored complex. The optical density of the samples was measured at a wavelength of 530 nm, and control was used as a control antioxidant. The formula determined total antioxidant activity (AOA):

$$AOA = \frac{ODc - ODe}{ODc} \times 100$$

where OD_c - optical density of the control sample; OD_e - optical density of the experimental sample (when *R. acicularis* extract was added)

Quantitative determination of ascorbic and gallic acids was carried out using the HPLC method using chromatograph "Millichrome A-02", company "EkoNova" (Russia). The chromatographic study was carried out on ProntoSIL 120-3-C18 AQ column, 75x2 mm, with a particle size of 5 μ m. The conditions for determination of gallic and ascorbic acids were as follows: eluent A - 0.4 M lithium perchlorate ($LiClO_4$), pH 2.4; eluent B - acetonitrile; gradient: regeneration – 2 % B (100 μ L), 1st step – 2 % B (400 μ L), 2nd step – 20 % B (400-2500 μ L); eluent flow rate – 100 μ L; detector wavelengths: ascorbic acid - 240 nm, gallic acid - 210 nm. The volume of the injected sample/sample is 10 μ L.

"Sigma-Aldrich" (USA) reagents were used as standards for calibration curves: L-ascorbic acid, substance content 99 %, MW: 176.12 (A92902); gallic acid, substance content 97.5 %, MW: 170.12 (149-91-7). To construct calibration curves for ascorbic acid and gallic acid, we prepared solutions of standards from 4 to 250 μ g/mL and 4 to 125 μ g/mL, respectively. The retention time was 2.8 min for ascorbic acid and 10.44 min for gallic acid.

The study's own results were statistically processed using the Microsoft Excel application program package and the IBM SPSS Statistics 24 statistical program. Mean values with confidence intervals were calculated.

Results

The study found that *R. acicularis* fruits extracts showed the highest antioxidant activity – 53 %, comparable to the control antioxidant ionol 41 %. Seed and leaf extracts showed antioxidant activity of 5 % and 44 %, respectively.

Further, the content of ascorbic and gallic acids in the extracts was determined. Figure 1. shows the chromatograms of aqueous extracts of leaves, fruits, and seeds of *R. acicularis*.

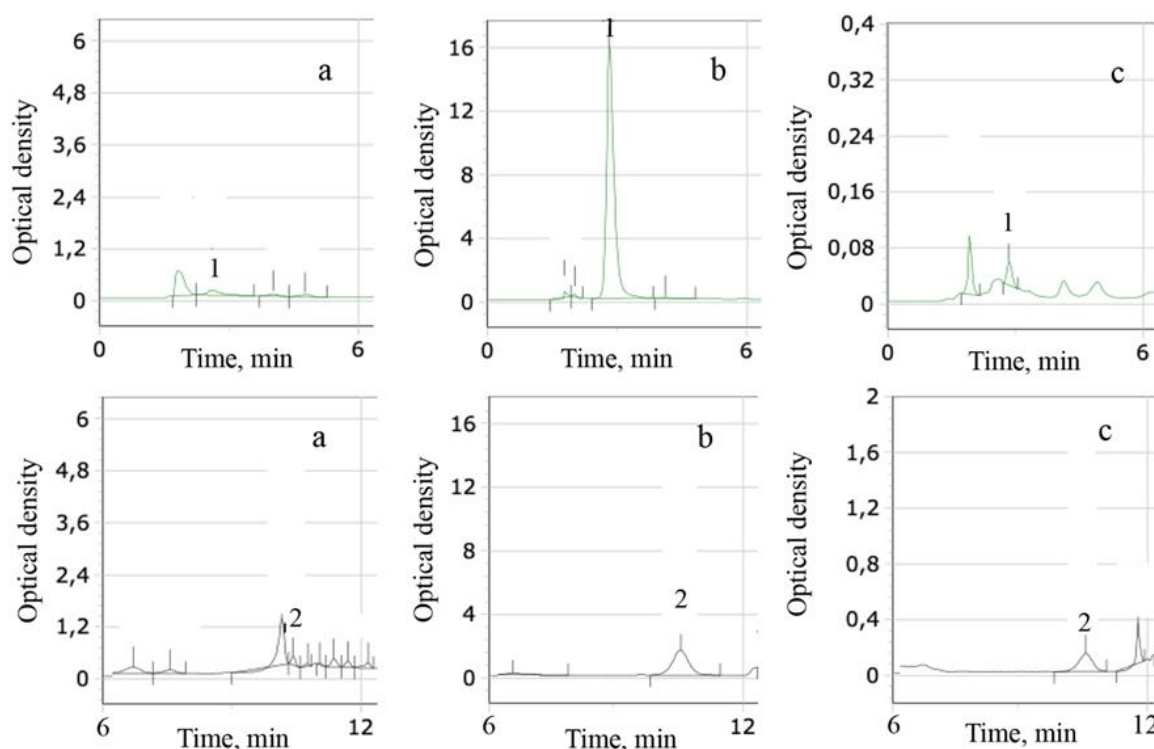


Fig. 1. Chromatograms of extracts of *R. acicularis*; a – leaves, b – fruits, c – seeds;
1 – ascorbic acid (240 nm), 2 – gallic acid (210 nm)

According to HPLC analysis, the maximum ascorbic acid content was found in fruit extracts 40.710 mg/g of dry weight (Table 1), while in leaf extracts, it was 0.540 (mg/g) and in seed extracts 0.314 (mg/g).

A high content of gallic acid was observed in fruits: 4 mg/g. Gallic acid content in seeds was 0.314 (mg/g), and in leaves was 0.144 (mg/g).

Table 1

Ascorbic and gallic acid content in R. acicularis extracts

Aqueous extracts	Ascorbic acid content, mg/g of dry weight	Gallic acid content, mg/g of dry weight
Fruits	40.710	4.354
Leaves	0.540	0.144
Seeds	0.060	0.314

Thus, the obtained data indicate high antioxidant activity of *R. acicularis* fruit and leaf extracts, which inhibit lipid peroxidation in the model system of yolk lipoproteins induced by ferrous sulfate. Meanwhile, ascorbic and gallic acid contents were higher in fruits: 75.388 and 30.236 times, respectively, compared to leaves; 678.500 and 13.866 times, respectively, compared to seeds. The antioxidant activity of fruit extracts is probably determined by the high content of ascorbic and gallic acids, while leaf extracts contain other substances that exhibit antioxidant properties. Further studies may be aimed at identifying substances with high antioxidant properties in *R. acicularis* leaf extracts.

Conclusion

Compared to leaves and seeds, the highest antioxidant activity was observed in aqueous extracts of *R. acicularis* fruits. The antioxidant activity in fruits correlates with a high ascorbic and gallic acid content.

References

1. Juan C.A., Pérez de la Lastra J.M., Plou F.J., Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 9. – P. 4642.
2. Forman H.J., Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy // *Nat Rev Drug Discov.* – 2021. – Vol. 20. – P. 652.
3. Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., & Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health // *Oxidative medicine and cellular longevity.* – 2017. – P. 8416763.
4. Zehiroglu C., Ozturk Sarikaya S.B. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies // *Journal of food science and technology.* – 2019. – Vol. 56, № 11. – P. 4757–4774.
5. Olennikov D.N., Chemposov V.V., Chirikova N.K. Metabolites of Prickly Rose: Chemodiversity and Digestive-Enzyme-Inhibiting Potential of *Rosa acicularis* and the Main Ellagitannin Rugosin D. *Plants (Basel).* – 2021. – Vol. 10, № 11. – P. 2525.
6. Makarov A.A. Bioactive Compounds in Plants of Yakutia. SO RAN. – Yakutsk, 1989. – P. 69–71.
7. Makarov A.A. Plant Medical Remedies of Yakut Traditional Medicine // Yakutsk : YaGU, 1974. – P. 52–57.
8. Shanina E.V., Rubchevskaya L.P. *Rosa acicularis* - a source of vitamins // *Chemistry of vegetable raw materials.* – 2003. – № 1. – P. 65–67.

УДК 535.8

**Исследование вариации газообмена легких под действием ОПА-аэрозоля
методами оптико-акустической спектроскопии и ИИ**

И.А. Тримасов

Научный руководитель: доцент, к.ф.-м.н., А.В. Борисов
Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина 36, 634050

E-mail: i.a.trimassov@mail.tsu.ru

**Investigation of the variation of lung gas exchange under the influence of OCA-aerosol
by methods of optical-acoustic spectroscopy and AI**

I.A. Trimassov

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., PhD., A.V. Borisov
Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: i.a.trimassov@mail.tsu.ru

Abstract. *In this study, we evaluated the variation of human lung gas exchange under the influence of model propylene glycol-glycerin OCA aerosols. We created three groups of volunteers: one under the influence of the OCA aerosol, one group of smokers who smoked tobacco cigarettes, and one group of non-smoking controls. The study used optical-acoustic spectroscopy to analyze exhaled air. The principal components method was used to analyze and process the spectra. For the absorption spectra of the exhaled air from all volunteers, we found three distinct variations: smokers of conventional cigarettes, non-smokers, and smokers of electronic cigarettes. The composition of exhaled air differed significantly between these groups. Volunteers who had experience smoking electronic cigarettes had a different composition of exhaled air compared to those who smoked conventional cigarettes or were non-smokers.*

Key words: *optical clearing agent, optical-acoustic spectroscopy, principal component method, exhaled air*

Введение

Оптические просветляющие агенты (ОПА) широко используются в оптических методах диагностики, таких как оптическая когерентная томография и спектрофотометрия [1]. Под воздействием ОПА в биотканях наблюдается временная частичная дегидратация, в результате ткань становится оптически однородной, что уменьшает рассеяние и увеличивает глубину визуализации [1, 2]. При перемещении метода оптического просветления тканей из ex vivo в in vivo необходимо учитывать требования безопасности и биосовместимости, что резко ограничивает спектр ОПА, которые можно применять при исследованиях организма человека. К широко используемым ОПА можно отнести глицерин и пропиленгликоль [3]. Данные компоненты малотоксичны и разрешены к применения в медицине и косметической промышленности. Однако эффект воздействия ОПА-аэрозолей на легочную ткань in vivo, включая изменение функциональных свойств, ранее не изучался.

Целью данной работы стала оценка вариаций газообмена легких под действием модельных ОПА-аэрозолей методами оптико-акустической спектроскопии и машинного обучения.

Материалы и методы исследования

Для проведения исследования была разработана модельная ОПА-смесь, содержащая пропиленгликоль и глицерин, которые являются основными компонентами жидкостей для электронных сигарет [4, 5]. Смесь не содержала никотин и ароматизаторы. Протокол исследования был одобрен Комитетом по биоэтике НИ ТГУ.

В исследование были вовлечены три группы участников. Целевая группа – добровольцы, имеющие опыт использования электронных сигарет (V), и две группы сравнения – здоровые добровольцы, которые никогда не использовали курительные смеси и не курили традиционные сигареты (Н), а также здоровые добровольцы-курильщики традиционных сигарет, которые никогда не использовали курительные смеси (S). У каждого добровольца бралось стандартное согласие на обработку персональных данных, все данные собирались обезличенно. Все участники заполняли модифицированный опросник оценки качества жизни, позволяющий получить количественные оценки общего состояния здоровья. Также в опросник были включены вопросы касательно стажа курения электронных и традиционных сигарет, приема медицинских препаратов, оценивающих влияние на легкие (ингаляторы, бронхоспазмолитики), наличие хронических заболеваний.

Цель исследования вариации газообмена легких под действием ОПА-аэрозоля методами оптико-акустической спектроскопии и искусственного интеллекта заключалась в оценке различий в спектрах поглощения проб выдыхаемого воздуха (ПВВ) участников целевой группы до и после воздействия ОПА, в том числе по сравнению с группами сравнения.

Добровольцам из группы V предлагалось в лабораторных условиях вдыхать модельную ОПА-смесь с помощью электронной сигареты, после чего осуществлялся забор проб выдыхаемого воздуха, которые затем использовались для регистрации спектров. Добровольцы из групп Н и S не подвергались воздействию ОПА-смеси перед забором проб выдыхаемого воздуха.

Для регистрации спектров поглощения ПВВ использовался лазерный оптико-акустический газоанализатор на основе CO_2 лазера. Пример спектра поглощения показан на рисунке 1.

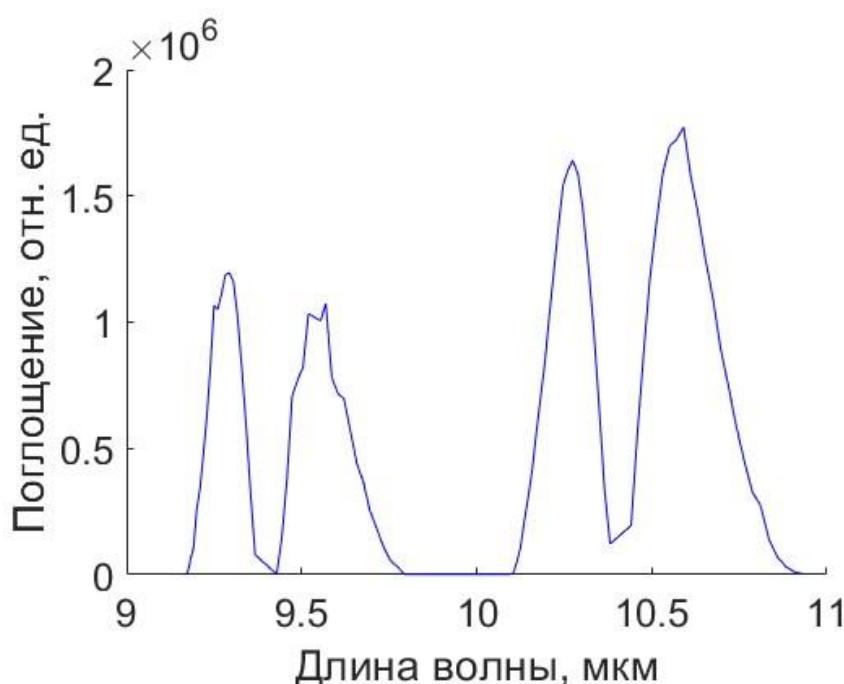


Рис. 1. Пример спектра поглощения ПВВ

Для всех спектров поглощения осуществлялась обработка, которая включала в себя фильтрацию и усреднение. Спектры после применения фильтрации и усреднения показаны на рисунке 2.

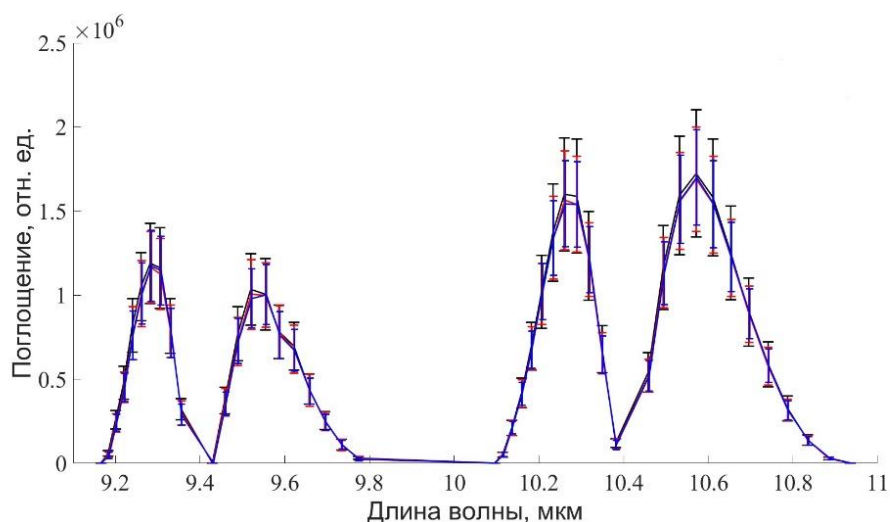


Рис. 2. Пример спектра поглощения после фильтрации и усреднения

Первичный анализ спектров поглощения ПВВ проводился с помощью метода главных компонент (МГК). Данный метод хорошо зарекомендовал себя для выделения информативных признаков и уменьшения размерности пространства признаков. МГК позволяет ранжировать ГК по уровню значимости, следовательно, имеет смысл осуществлять проверку на разделимость групп начиная с первых ГК, пока разделимость не будет достигнута, либо не будет осуществлен полный перебор ГК.

Результаты

В результате применения МГК были получены проекции спектров поглощения ПВВ в пространство различных компонент для разных диапазонов. После обработки данных с использованием МГК было обнаружено, что существует пространство главных компонент, в которых группы сравнения разделимы между собой и целевой группой V, на которую воздействовали ОПА-аэрозолем.

Заключение

Благодаря МГК стало возможным оценить вариации газообмена легких под действием ОПА-аэрозолей и получить разделение групп сравнения с целевой группой. Это может говорить о том, что существуют изменения в составе выдыхаемого воздуха людей, регулярно пользующихся курительными смесями. Для оценки кратковременного эффекта может потребоваться улучшение алгоритмов обработки, т.к. осуществление полного перебора ГК для разделения вручную не представляется возможным.

Список литературы

1. Oliveira L.M.C., Tuchin V.V. The optical clearing method: A new tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering // Springer Nature. – 2019.
2. Tuchin V.V., Zhu D., Genina E.A. (ed.). Handbook of tissue optical clearing: new prospects in optical imaging // CRC Press. – 2022.
3. Messner B., Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. – 2014. – V. 34, № 3. – P. 509–515.
4. Grana R., Benowitz N., Glantz S.A. E-cigarettes: a scientific review // Circulation. – 2014. – V. 129, № 19. – P. 1972–1986.
5. Ooi B.G. et al. Influence of the e-cigarette emission profile by the ratio of glycerol to propylene glycol in e-liquid composition // ACS omega. – 2019. – V. 4, № 8. – P. 13338–13348.

УДК 612.118.221.3

**Влияние модификации поверхности гидроксиапатита бамбус[6]урилом
на гемолитический эффект**У.В. Турнаева, Д.А. Федоришин, А.Э. Ухов

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

Национальный исследовательский Томский государственный университет

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

E-mail: ulaunatur@gmail.com**Effect of hydroxyapatite surface modification by bambus[6]uril on hemolytic effect**U.V. Turnayeva, D.A. Fedorishin, A.E. Ukhov

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

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

E-mail: ulaunatur@gmail.com

Abstract. The use of hydroxyapatite in medicine is becoming particularly relevant today. One way to improve biocompatibility is to modify these materials with nitrogen-containing supramolecular heterocycles. In this study, the cytocompatibility of BU[6]-modified hydroxyapatite was investigated by evaluating its hemolytic activity. The low hemolytic activity of BU[6]-modified samples was demonstrated.

Key words: hydroxyapatite, bambus[6]uril, hemocompatibility

Введение

В настоящее время в медицине возникает потребность в создании биоактивных материалов для имплантов. Импланты, предназначенные для высвобождения лекарств, стали хорошей альтернативой традиционным методам доставки лекарств. Таким материалом перспективно может быть гидроксиапатит [1].

Гидроксиапатит (НА) – это минерал, который является главным компонентом костей. Искусственно модифицированный гидроксиапатит, обогащенный биоактивными соединениями, служит инструментом для создания материалов, которые могут обладать заданными свойствами. В медицине он служит в качестве импланта для стимуляции роста новой кости [1].

В области модификации поверхности пористых материалов подходящими претендентами оказываются макромолекулярные системы, построенные на основе бамбус[6]урила (BU[6]). Бамбус[6]урил (BU[6]) обладает способностью инкапсулировать терапевтические агенты, создавая супрамолекулярные ансамбли, способствующие контролируемому и устойчивому высвобождению лекарств [2].

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

Целью исследования является оценка гемосовместимости гидроксиапатита модифицированного бамбус[6]урилом.

Материалы и методика исследования

Образцы представляли собой таблетки шириной 20 мм и толщиной около 1 мм, которые подвергали прокаливанию при 600 °С.

Для нанесения BU[6] на пористые неорганические поверхности был использован метод погружения в раствор. Для этого была приготовлена дисперсия BU[6] в воде концентрацией

1 мг/мл в деионизированной воде, объем раствора составил 15 мл. Затем образец НА погрузили в раствор BU[6] и оставили взаимодействовать в течение 40 минут. После раствор декантировали, а полученные композитные образцы НА+BU[6] подвергали мягкой сушке на воздухе при комнатной температуре до достижения стабильного веса.

Для оценки гемосовместимости образцов использовалась цельная гемостатированная кровь здорового донора. Кровь центрифугировали и отделяли эритромассу. Полученную эритромассу разводили стерильным раствором 1X PBS с температурой 37 °C в соотношении 1:9. Образцы помещали в стандартный 12-луночный планшет для культивирования клеток и заливали полученным раствором крови в PBS в соотношении 1 мл раствора на 1 см² площади поверхности образца. В качестве положительного контроля (100 % гемолиз) использовали деионизированную воду, в качестве отрицательного контроля использовали раствор 1X PBS (0 % гемолиз). Затем планшет инкубировали в термостате при 37 °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 стандартный 96-луночный планшет для спектроскопического анализа и считывали оптическую плотность с помощью ИФА-ридера Tecan Infinite F50 (Tecan inc., USA) при 492 нм.

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

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

Адсорбцию белков плазмы на разработанных нами образцах исследовали с помощью модифицированного метода истощения раствора. Этот подход предполагает два количественных определения концентрации белка в плазме крови – до и после инкубации образцов [3].

Статистический анализ проводился с использованием программы STATISTICA 8.0 для Windows (STATISTICA, RRID: SCR_014213). Были реализованы тест Манна-Уитни и t-критерий для независимых групп. Результаты считались достоверными при *** $p < 0,001$, * $p < 0,01$ и * $p < 0,05$.

Результаты

Результаты экспериментальной оценки уровня гемолитической активности образцов представлены в таблице 1 в сравнении с немодифицированным гидроксиапатитом и бамбус[6]урилом.

Таблица 1

Уровень гемосовместимости образцов НА, BU[6] и НА+BU[6]

№	Образец	Гемолиз (%)
1	НА	1.6814 ± 0.0012*
2	BU[6]	0.2989 ± 0.0017
3	НА+BU[6]	0.9884 ± 0.0033
4	CTRL 100 %	100
5	CTRL 0 %	0

Примечание: НА – гидроксиапатит; BU[6] – бамбус[6]урил; CTRL – контроль.

* – уровень гемолиза достоверно отличается от отрицательного контроля ($p < 0,05$).

Образец немодифицированного гидроксиапатита проявлял гемолитическую активность 1,6814 %, аналогичную гемолитическую активность проявляли образцы BU[6] 0,2989 % и НА+BU[6] 0,9884 %, но статистически значимых различий между этими группами, а также отрицательным контролем (CTRL 0 %) не было установлено ($p > 0.05$).

Гемолитическая активность НА может быть связана с уменьшением пористости при обработке различными веществами. Гемолиз на поверхности инертных биоматериалах

связан с адсорбцией белков плазмы на контактирующей с кровью поверхности материала, где более высокая адсорбция белков плазмы соответствует повышению гемолиза.

Адсорбция белка происходит на любой абиотической поверхности, и характер адсорбированного белкового слоя зависит от величины и разности потенциалов на поверхности. Если положительный потенциал материала превышает потенциал крови, то вероятность образования тромбов возрастает. Следовательно, можно предположить, что BU[6] являясь сильным комплексообразователем, связывает ионы из раствора крови, снижая положительный потенциал поверхности материала, тем самым уменьшая адсорбцию белка плазмы крови и повышая гемосовместимость.

Из данных, приведенных в таблице 2, видно, что образец НА снижает концентрацию белка в плазме после инкубации, что было подтверждено статистически ($p < 0,05$). Кроме того, они показали более высокую адсорбцию белка, чем образцы НА+BU[6].

Таблица 2

Уровень адсорбции белков плазмы в образцах НА, BU[6] и НА+BU[6]

№	Образец	Оптическая плотность	Δ оптической плотности
1	НА	$0.1359 \pm 0.0115^*$	0.1255^*
2	BU[6]	0.2318 ± 0.0237	0.0382
3	НА+BU[6]	0.2100 ± 0.0330	0.0600
4	CTRL (PBS)	0.1228 ± 0.0059	0.1472
5	CTRL (Плазма)	0.2700 ± 0.0164	0.0000

Примечание: НА – гидроксиапатит; BU[6] – бамбус[6]урил; CTRL (PBS) – холостой эксперимент; CTRL (Плазма) – содержание белка в интактной плазме.

* – уровень адсорбции достоверно отличается от положительного контроля ($p < 0,05$).

Проведенное исследование показывает, что модификация бамбус[6]урилом гидроксиапатита повышает его гемосовместимость и снижает адсорбцию белка.

Заключение

Установлено, что использование BU[6] приводит к существенному улучшению гемосовместимости гидроксиапатита. Также экспериментально доказано, что бамбус[6]урил снижает адсорбцию белка плазмы крови.

Гидроксиапатит – легкодоступный пористый материал с высокой биосовместимостью. Таким образом, модификация бамбус[6]урилом гидроксиапатита позволит создать перспективные материалы для контролируемого высвобождения лекарств. Этот инновационный биокompозит обладает многообещающим потенциалом для тонкой модуляции биологических реакций через взаимодействия хозяин – гость, облегчаемое связыванием BU[6] на специальных носителях.

Исследование поддержано грантом РНФ 24-43-20044.

Список литературы

1. Вихров С.П., Холомина Т.А., Бегун П.И., Афонин П.Н. Биомедицинское материаловедение // Горячая линия. – Москва : Телеком, 2006.
2. Lizal T.; Sindelar V. Bambusuril Anion Receptors // Isr. J. Chem. – 2018. – V. 58. – P. 326–333.
3. Zhumabayeva G, Turebayeva P, Ukhov A, et al. Development of Novel Composite Biocompatible Materials by Surface Modification of Porous Inorganic Compounds Using Bambus[6]Uril. // Materials. – 2023. – V. 16. – P. 7257.

УДК 612.015.3:616-056.52:616.69-008.6

**Перспективы применения нового препарата на основе гиалуронидазы
при экспериментальном токсическом циррозе печени у возрастных крыс**

И.А. Узьянбаев¹, Э.А. Ахтямова¹, Л.В. Когай^{1,2}

Научный руководитель: д.м.н., А.В. Пахомова

¹Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга
Россия, Томск, пр. Ленина, 3, 634028

²Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России
Россия, Челябинск, ул. Воровского, 64, 454092

E-mail: wertyg233@gmail.com

**Prospects for the use of a new drug based on hyaluronidase
at experimental toxic liver cirrhosis in aged rats**

I.A. Uzyanbaev¹, E.A. Akhtyamova¹, L.V. Kogai^{1,2}

Scientific Supervisor: Dr., A.V. Pakhomova

¹Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Russia, Tomsk, Lenin str., 3, 634028

²South-Ural State Medical University, Russia, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64, 454092

E-mail: wertyg233@gmail.com

Abstract. *The morbidity of liver cirrhosis (LC) has increased worldwide. LC is induced by various causes. The impaired hyaluronidase activity in the liver plays a major role in pathogenesis of this disease. Therefore, the search for drugs that can influence the metabolism of hyaluronidase is promising. Experiments were performed on male Wistar rats. Toxic cirrhosis was induced administration of carbon tetrachloride (CTC), and ethanol. Bovhyaluronidase azoximer (BHA) at a dose of 600 U/kg was administered intramuscularly from days 90 to 120. Biochemical, histological, morphological, ultrasound and cytometric research methods were used in the study. The results of the experiment showed a positive effect of BHA on the liver rats: the area of fibrous masses in the liver parenchyma decreased, the intensity of hemodynamic disturbances decreased, normalization of biochemical parameters in the blood. Positive developments in the liver under BHA have been underpinned by the ability of the drug to influence the regeneration of liver cells, in particular, CD326⁺ liver cells of rats with cirrhosis. Thus, the studied drug showed therapeutic activity in an experimental model of toxic cirrhosis in aged rats.*

Key words: liver cirrhosis, age-related changes in liver, rats.

Введение

Цирроз печени (ЦП) является важной социальной и медицинской проблемой современности, так за 10 лет число случаев цирроза печени увеличилось на 11 % у мужчин и на 16 % у женщин [1]. Как известно, с возрастом риск развития хронических заболеваний, в том числе ЦП, резко возрастает [2]. Данное обстоятельство во многом определяется тем, что по мере старения изменяется количество и функциональная активность стволовых клеток и клеток, участвующих в выполнении физиологических функций печени, происходит активное замещение паренхимы печени соединительной тканью, активность процессов фибринолиза снижается [2]. Поэтому разработка новых методов лечения ЦП с учетом возрастных особенностей организма является важной задачей.

Механизм развития ЦП не ясен. Отправной точкой фиброза считается смерть гепатоцитов, происходит высвобождение из них паттернов, связанных с повреждением (ПСП), активируются звездчатые клетки печени (ЗКП), которые постепенно изменяют свою звездчатую морфологию и начинают продуцировать компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ), одним из важнейших компонентов которого является гиалуроновая кислота [3]. Основным ферментом, регулирующим метаболизм ГК, является гиалуронидаза (ГД), которая

расщепляет ГК на глюкозамины и глюкуроновую кислоту, ремодулируя ВКМ. При ЦП наблюдается нарушение активности ГД в печени [4]. Поэтому нами выбран препарат, бовгиалуронидаза азоксимер, ранее показавший антифибротическую активность [5].

Следует отметить, что регенерацию печени обеспечивают печеночные клетки-предшественники, имеющие как эпителиальные, так и мезенхимальные маркеры. Известно как минимум два маркера для идентификации печеночных клеток-предшественников, участвующих в регенерации печени: ЕрСАМ (CD326) и CD90 [6].

В связи с вышеизложенным, доклиническое исследование препарата с известными противовоспалительными и антифибротическими свойствами, по новому назначению, направленному на предотвращение прогрессирования цирроза печени, актуально.

Экспериментальная часть

Эксперименты были проведены на крысах-самцах Вистар (возраст 12 месяцев). Токсический ЦП печени моделировали внутрижелудочным введением 40 % масляного раствора тетрахлоруглерода (ТХУ), дополнительно в свободном доступе применялся раствор с 5 % содержанием этанола и глюкозы. Препарат бовгиалуронидаза азоксимер (БГА) («НПО Петровакс Фарм») вводили внутримышечно в дозе 600 МЕ/кг, начиная с 90 дня после первого введения ТХУ, 1 раз в сутки в течение 30 дней.

Для исследования структуры печени срезы ткани окрашивали гематоксилином и эозином, для оценки содержания соединительной ткани - по Ван Гизону. Биохимические исследования сыворотки крови на предмет содержания в ней щелочной фосфатазы (ЩФ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) проводили согласно общепринятым биохимическим методикам.

УЗИ печени проведено с помощью высокочастотной ультразвуковой платформы для работы с мелкими лабораторными животными *in vivo* VEVO 3100 LT (VisualSonics, Канада). Для определения экспрессии маркеров прогениторных клеток печени CD45, CD133, CD90 и CD326 на моноклеарах печени использовался метод проточной цитометрии.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики в программе SPSS 12.0 (IBM). Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0.05$.

Результаты

При гистологическом исследовании на фоне введения ТХУ и этанола печень крыс патологического контроля имела признаки ЦП (увеличена в размере, деформирована, поверхность печени бугристая с узлами регенерации и прослойками фиброзной ткани, с сетчатым рисунком). Микроскопия препаратов печени патологического контроля показала развитие мультилобулярного постнекротического цирроза печени с жировой дистрофией гепатоцитов и зонами обширного воспаления. УЗИ печени крыс патологического контроля выявило изменения, характерные для ЦП: асцит, увеличенный диаметр портальной вены, огрубевшая, неоднородная паренхима, у одного животного обнаружен изоэхогенный узел.

Терапия БГА оказала положительный эффект: печень крыс была с острыми и ровными краями, имела мелкобугристую поверхность, отсутствовали узлы регенерации, прослеживался равномерный сосудистый рисунок; отмечалась нормализация балочного строения печени, практически полное отсутствие гепатоцитов с жировой дистрофией и существенное снижение воспалительного инфильтрата. Под влиянием БГА наблюдалось уменьшение площади соединительной ткани в печени крыс по сравнению группой животных с ЦП. При УЗИ печени у животных, получавших БГА, не наблюдалось асцита, не обнаруживались узлы, прослеживалась тенденция к снижению диаметра портальной вены. Терапия БГА у крыс, получавших ТХУ и этанол, вызывала понижение показателей АЛТ (1,5 раза, $p < 0,05$) и АСТ (в 1,4 раза, $p < 0,05$) по отношению к животным с ЦП без лечения.

Известно, что при ЦП на фоне развившегося воспаления и формирования рубцовой ткани нарушается регенерация клеток печени. У животных с ЦП в паренхиме увеличивались популяции гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) (в 5,1 раза выше, чем у интактных животных ($p < 0,01$), $CD45^+$ пан-лейкоцитарных клеток (в 6,5 раз выше, чем у интактных животных ($p < 0,001$), мезенхимальных стволовых клеток (МСК), а также значительно возрастало количество эпителиальных клеток различной степени зрелости. Введение исследуемого препарата достоверно не изменяло уровень ГСК, однако, способствовало снижению в 2,5 раза ($p = 0,003$) $CD45^+$ пан-лейкоцитарных клеток, МСК – в 1,5 раза ($p = 0,05$). На фоне действия БГА уровень овальных клеток ($CD45^-CD326^+CD133^+CD90^+$) был снижен в 3,8 раза ($p = 0,02$) относительно патологического контроля, хотя и был значительно выше уровня интактных животных.

Оценка уровня бипотентных предшественников гепатоцитов $CD45^-CD326^+CD133^-$ выявила их снижение под влиянием препарата в 2 раза ($p = 0,02$) по сравнению с животными с ЦП без лечения. При этом, популяция зрелых эпителиальных клеток ($CD45^-CD326^+CD133^-$) на фоне введения БГА возрастала в 3,1 раза ($p < 0,001$) по сравнению с патологическим контролем и в 55 раз по сравнению в интактным контролем ($p < 0,001$). При ЦП происходит увеличение пролиферации эпителиальных клеток, что, однако, приводит к появлению узлов регенерации и в дальнейшем к рубцеванию и ухудшению функции печени. Увеличение под влиянием БГА зрелых эпителиальных клеток, снижение уровня воспалительных клеток на фоне позитивных изменений гистологических, биохимических и морфометрических показателей, может говорить о влиянии препарата на регенерацию полноценных эпителиальных клеток.

Заключение

Впервые показана способность бовгиалуронидаза азоксимера, препятствовать развитию токсического цирроза печени у возрастных крыс. На фоне введения препарата наблюдалось уменьшение площади соединительной ткани в печени, снижалась интенсивность воспалительных реакций, и восстанавливалось балочное строение печени, нормализовались биохимические показатели крови. Позитивные изменения в печени крыс с ЦП при терапии БГА сопровождалась влиянием препарата на регенерацию гепатоцитов. Таким образом, исследованный нами препарат перспективен для дальнейших исследований в этом направлении.

Список литературы

1. Tan D., Chan K.E., Wong Z.Y. Global Epidemiology of Cirrhosis: Changing Etiological Basis and Comparable Burden of Nonalcoholic Steatohepatitis between Males and Females // Digestive diseases (Basel, Switzerland). – 2023. – Vol. 46, № 6. – P. 900–912.
2. Tominaga K., Suzuki H.I. TGF- β signaling in cellular senescence and aging-related pathology // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20, № 20. – P. 5002.
3. Zhou W.C. Zhang Q.B., Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis // World journal of gastroenterology. – 2014. – Vol. 20, № 23. – P. 7312–7324.
4. Kaul A., Short W.D., Wang X., Keswani S.G. Hyaluronidases in Human Diseases // International journal of molecular sciences. – 2021. – V. 22 (6). – P. 3204.
5. Pakhomova A., Pershina O., Bochkov P., Ermakova M., Pan E., Sandrikina L., Dagil Y., Kogai L., Grimm W.D., Zhukova M., Avdeev S. Anti-Inflammatory and Antifibrotic Potential of Longidaze in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis // Life (Basel). – 2023. – Vol. 13, № 9. – P. 1932.
6. Dollé L. Theise N., Schmelzer E., Boulter L., Gires O., van Grunsven L.A. EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2015. – V. 15, № 308(4). – P. G233–250.

УДК 576.08

**Уровень внутриклеточных липидов в мононуклеарах периферической крови
при сахарном диабете 1 типа**А.А. Уфандеев, Е.Е. Буйко, Л.В. Ефимова

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

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

Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России,

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

E-mail: ufandeev@gmail.com**Level of intracellular lipids in peripheral blood mononuclear cells
in type 1 diabetes**A.A. Ufandeev, E.E. Buyko, L.V. Efimova

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

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

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

E-mail: ufandeev@gmail.com

Abstract. *The aim of the current study was to assess the intracellular lipid droplet accumulation in peripheral blood mononuclear cells using the fluorescent dye BODIPY 493/503 in individuals with type 1 diabetes. The findings demonstrated that cells isolated from the blood of a patient diagnosed with type 1 diabetes exhibited elevated level of intracellular lipids in comparison to mononuclear cells derived from a healthy volunteer, as indicated by the heightened fluorescence intensity of BODIPY 493/503 dye visualized under fluorescence microscopy.*

Key words: *type 1 diabetes, peripheral blood mononuclear cells, neutral lipids.*

Введение

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

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

В недавних экспериментах было показано, что нарушения углеводного и липидного метаболизма, приводящие к повышению уровней свободных жирных кислот и активных форм кислорода, способствуют развитию воспаления и поляризации моноцитов по провоспалительному пути. Имеющиеся на сегодняшний день данные указывают на то, что такие нарушения в клинической практике ведения пациентов с сахарным диабетом 1 типа могут быть выявлены *ex vivo* в изолированных клетках в виде изменения уровня нейтральных липидов [6–8].

Визуализация внутриклеточных липидных капель с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием красителя BODIPY 493/503 находит широкое применение для выявления липидных капель в разнообразных клетках, включая моноцитарную фракцию мононуклеаров периферической крови [9–11].

Цель исследования – оценить уровень внутриклеточных липидов в мононуклеарах периферической крови с использованием флуоресцентного красителя BODIPY 493/503 при сахарном диабете 1 типа.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования были использованы мононуклеары, выделенные из периферической крови пациента Л. (42 года), госпитализированного в клиники ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава РФ с диагнозом E10.7 – Инсулинзависимый сахарный диабет: с множественными осложнениями. Сопутствующий диагноз: Ожирение 1 стадии, I степени (ИМТ 31,62 кг/м²). Диагностирована гипертоническая болезнь II стадии, достигнутая степень артериальной гипертензии 1. Риск сердечно-сосудистых осложнений 4. Хроническая сердечная недостаточность 1 степени. Стаж заболевания 11 лет. Уровень глюкозы в крови 15,8 ммоль/л, гликированный гемоглобин – 8,56 %. АД 160/90. Суточная доза инсулина 1,21 ЕД/кг, базальная доза 0,87 ЕД/кг.

В качестве контрольного объекта использовали мононуклеары, выделенные из периферической крови здорового добровольца В (50 лет). Уровень глюкозы в крови 5,5 ммоль/л, гликированный гемоглобин – 5,20 %. АД 120/80.

После выделения мононуклеарной фракции периферической крови готовили суспензию клеток с концентрацией $0,5 \times 10^6$ клеток/1 мл раствора Хэнкса (ООО НПП «ПанЭко», Россия). Клетки отмывали центрифугированием 2000 rpm 5 минут при комнатной температуре, надосадочную жидкость удаляли. К осадку добавляли 200 мкл рабочего раствора липофильного красителя BODIPY 493/503 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) (4 мкМ), пробы инкубировали в течение 20 минут при 37 °С. Затем клетки отмывали от несвязавшегося красителя дважды PBS 1X (ООО НПП «ПанЭко», Россия) центрифугированием 2000 rpm 5 минут при комнатной температуре. Осадок ресуспендировали в 100 мкл PBS 1X и переносили на поверхность чашки для конфокальной микроскопии. Полученную клеточную суспензию визуализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM6 (Leica Microsystems GmbH, Германия).

Результаты

Микрофотографии популяций мононуклеаров, выделенных из периферической крови и окрашенных BODIPY 493/503, представлены на рисунке 1 (А – здоровый доброволец; Б – пациент).

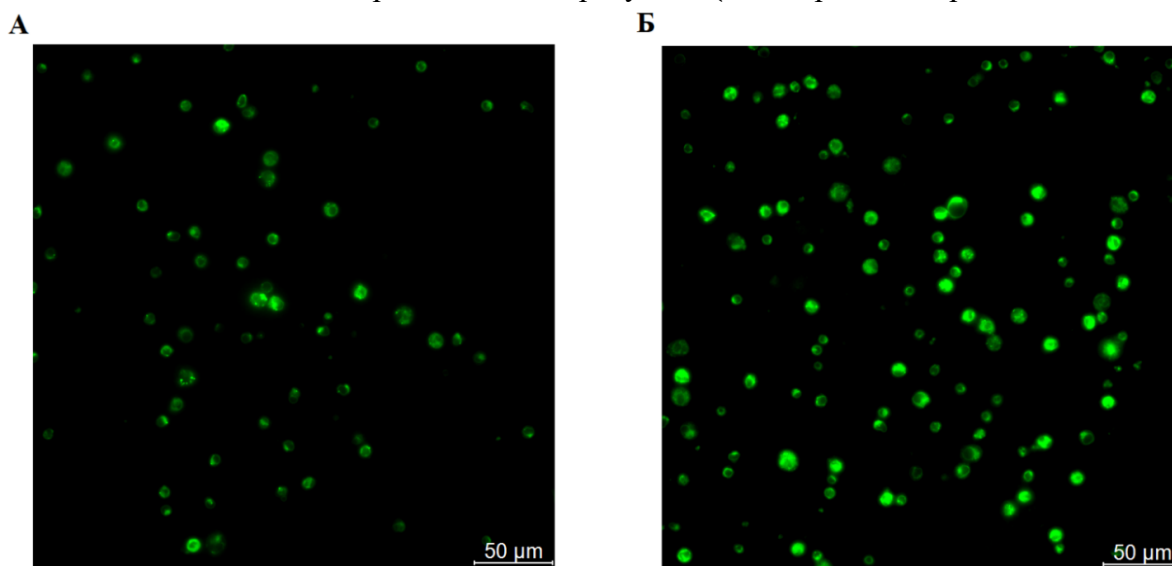


Рис. 1. Визуализация внутриклеточных липидов в мононуклеарах, выделенных из периферической крови здорового добровольца (А) и пациента с сахарным диабетом 1 типа (Б), методом флуоресцентной микроскопии с липофильным красителем BODIPY 493/503

В результате проведенной флуоресцентной микроскопии со специфическим красителем BODIPY 493/503 установлено, что в клетках, выделенных из крови пациента с диагнозом сахарный диабет 1 типа, в отличие от мононуклеаров здорового добровольца, визуально наблюдается более интенсивная флуоресценция красителя BODIPY 493/503, отражающая повышенный уровень внутриклеточных липидов. Более высокий уровень внутриклеточных липидов в мононуклеарах периферической крови пациента с сахарным диабетом 1 типа отражает дефекты метаболизма липидов и трансдукции клеточных сигналов в иммунных клетках периферической крови.

Заключение

В проведенном исследовании показано, что развитие сахарного диабета 1 типа сопровождается повышением уровня внутриклеточных нейтральных липидов в мононуклеарах периферической крови.

Список литературы

1. Akil A.S., Yassin E., Al-Maraghi A., Aliyev E., Al-Malki K., Fakhro K.A. Diagnosis and treatment of type 1 diabetes at the dawn of the personalized medicine era // *Journal of Translational Medicine*. – 2021. – Vol. 19, № 1. – P. 1–19.
2. Peterkova V.A., Shestakova M.V., Bezlepina O.B., Laptev D.N., Kuraeva T.L., Mayorov A.Y., Khramova E.B. Diabetes mellitus type 1 in childhood // *Diabetes mellitus*. – 2020. – V. 23, № 1S. – P. 4–40.
3. Htay T., Soe K., Lopez-Perez A., Doan A.H., Romagosa M.A., Aung K. Mortality and cardiovascular disease in type 1 and type 2 diabetes // *Current cardiology reports*. – 2019. – V. 21. – P. 1–7.
4. Cai X., Li J., Cai W., Chen C., Ma J., Xie Z., Zhao J. Meta-analysis of type 1 diabetes mellitus and risk of cardiovascular disease // *Journal of Diabetes and its Complications*. – 2021. – V. 35, № 4. – P. 107833.
5. Swasey K.K., Orchard T.J., Costacou T. Trends in cardiovascular risk factor management in type 1 diabetes by sex // *Journal of Diabetes and its Complications*. – 2018. – V. 32, № 4. – P. 411–417.
6. Jones I.V., Coleman E.L., Husni N.R., Deeney J.T., Raval F., Steenkamp D., Corkey B.E. Type 1 diabetes alters lipid handling and metabolism in human fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, № 12. – P. e0188474.
7. Ivanov V.V., Buyko E.E., Ufandeev A.A., Nevskaya K.V., Udut E.V., Poluektova K.I., Udut V.V. Intracellular Lipid Levels and Oxidative Stress in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Experimental Type 1 Diabetes Mellitus // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2023. – P. 1–4.
8. Ivanov V.V., Buyko E.E., Ufandeev A.A., Nevskaya K.V., Udut V.V., Zima A.P., Saprina T.V., Udut E.V. Insulin resistance in experimental type 1 diabetes mellitus // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2022. – V. 172, № 6. – P. 691–694.
9. Qiu B., Simon M.C. BODIPY 493/503 staining of neutral lipid droplets for microscopy and quantification by flow cytometry // *Bio-protocol*. – 2016. – Vol. 6, № 17. – P. e1912-e1912.
10. Fam T.K., Klymchenko A.S., Collot M. Recent advances in fluorescent probes for lipid droplets // *Materials*. – 2018. – Vol. 11, № 9. – P. 1768.
11. Wolins N.E., DeHaan K.N., Cifarelli V., Stoeckman A.K. Normalized neutral lipid quantitation by flow cytometry // *Journal of lipid research*. – 2018. – Vol. 59, № 7. – P. 1294–1300.

УДК 616.33-006.6-059:575.113

**Роль уровня экспрессии генов химиочувствительности и генов
ABC-транспортеров в назначении персонализированного лечения
больным раком желудка IV стадии**

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

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

¹Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук
Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634009

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

E-mail: tsydenova422@gmail.com

**Role of the expression level of chemosensitivity genes and ABC transporter genes
in prescribing personalized treatment for patients with stage IV gastric cancer**

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

Scientific Supervisor: Prof., Dr., N.V. Litviakov

¹Cancer research institute of Tomsk National Research Medical Center, Russia, Tomsk, per.
Cooperativniy, 5, 634009

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

E-mail: tsydenova422@gmail.com

Abstract. *Peritoneal carcinomatosis is an extremely unfavorable variant of gastric cancer (GC) progression. Significant efforts are being made to understand the mechanism of this resistance and improve treatment outcomes. Metastatic tumors are known to have heterogeneity between primary and metastatic sites. This type of heterogeneity is the cause of low efficacy of therapy. In this regard, a comparative analysis of ABC-transporter gene expression and chemosensitivity genes will help to determine the resistance and sensitivity of the tumour to therapy and provide a basis for a personalized approach to treatment.*

Key words: *peritoneal carcinomatosis, personalized treatment, intratumoral heterogeneity.*

Введение

Перитонеальный канцероматоз является крайне неблагоприятным вариантом прогрессирования рака желудка (РЖ). Предпринимаются значительные усилия, чтобы понять механизм этой устойчивости и улучшить результаты лечения. Перитонеальный канцероматоз при раке желудка является одним из самых частых путей диссеминации с медианой выживаемости не более 6 мес. Возможности лечения РЖ с перитонеальной диссеминацией ограничены, химиолучевая терапия не показана, системная химиотерапия без «перитонеального контроля» демонстрирует неудовлетворительные результаты. Однако при всем этом основным методом лечения остается системная химиотерапия (ХТ), которая назначается эмпирически, без учета молекулярных мишеней ее действия. Высокая эффективность персонализированного назначения ХТ на основе оценки чувствительности и резистентности опухоли к определенным химиопрепаратам по экспрессии генов химиочувствительности показана в исследованиях, проведенных в нашем институте при немелкоклеточном раке легкого и раке молочной железы. В то же время в литературе отсутствует информация о молекулярно-генетических исследованиях для выбора цитостатиков при раке желудка, в том числе и IV стадии.

Цель исследования: оценка эффективности персонализированного назначения химиотерапии на основе анализа межсайтовой гетерогенности экспрессии генов семейства

АВС-транспортеров и генов химиочувствительности при комбинированном лечении больных раком желудка IV стадии с перитонеальным канцероматозом [1].

Экспериментальная часть

В исследование включено 70 пациентов, проходивших лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ с 2014 по 2021 г., с морфологически верифицированным диагнозом РЖ IV стадии, с подтвержденным перитонеальным канцероматозом и асцитом, при отсутствии других отдаленных метастазов. В контрольную группу ($n = 35$) были включены больные, прошедшие лечение в период с 2014 по 2017 г., которым выполнялась циторедуктивная операция с последующей стандартной послеоперационной химиотерапией по схеме FOLFOX. В основную группу было проспективно включено 35 пациентов, которым выполнялась циторедуктивная операция, затем проводилась персонифицированная системная и интраперитонеальная химиотерапия, подобранная на основании оценки уровней экспрессии генов *ABCC5*, *BRCA1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *RRM1*, *ERCC1* и *TYMS* методом ПЦР в режиме реального времени в первичной опухоли, метастазах в лимфоузле и брюшине. Затем проводилась персонифицированная системная химиотерапия по схемам: FOLFIRI, TPFL, XELIRI, PC и GemCar и интраперитонеальная химиотерапия. Для исследования был использован операционный материал (опухолевая ткань желудка, неизмененная ткань желудка, канцероматоз, материал метастаза в лимфатический узел). РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany). Уровень экспрессии генов АВС-транспортеров: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* и генов химиочувствительности: *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* оценивали при помощи обратнотранскриптазной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) по технологии TaqMan на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Australia).

Статистический анализ проведён с использованием прикладного пакета «IBM SPSS Statistics» версии 22.0 (IBM Corp., USA). Для оценки эффективности циторедуктивных операций у пациентов с РЖ с перитонеальной диссеминацией применяли 3 критерия: D – объем лимфодиссекции, R – резидуальная опухоль по границам резекции и полнота циторедукции (CC Score). Для анализа общей выживаемости, безрецидивной выживаемости и медианы до прогрессирования заболевания использовались кривые выживаемости Каплана–Майера. Сравнение достоверности различий между группами проводилось с помощью LogRank test. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты

Выявлен высокий уровень экспрессионной гетерогенности у пациентов с РЖ. Сравнение экспрессии генов семейства АВС-транспортеров продемонстрировало, что только ген *ABCC1* показал статистически значимую разницу в уровне экспрессии между исследуемыми сайтами по каждому пациенту. Среди генов химиочувствительности гиперэкспрессия в этих тканях была характерна только для *TOP2a* ($17,2 \pm 5,9$; max 161,9; $10,8 \pm 4,1$; max 105,1; $35,3 \pm 0,8$; max 439,6 соответственно). Аналогичные результаты получены для *BRCA1*. Достоверные различия в уровне экспрессии наблюдаются между опухолевой тканью и канцероматозом ($p = 0,005$) и метастазом в ЛУ и канцероматозом ($p = 0,01$).

Схемы назначения в зависимости от уровня экспрессии генов химиочувствительности в разных сайтах были следующими: FOLFIRI + C; TRFL + C; XELIRI + C; PC; GemCar + C. Сроки наблюдения за больными составили от 10 до 37,9 мес. В основной группе медиана времени без прогрессирования (ВБП) составила 15,8 мес, с интерквартильным размахом (13,5–19,1), в группе контроля – 11,2 (10,3–11,6) мес ($p < 0,001$; $\chi^2 = 47,662$) (рис. 1). Медиана общей выживаемости (ОВ) в основной группе составила 18,7 мес, с интерквартильным размахом (15,0–24,3), в контрольной группе – 12,7 (11,3–13,1) мес ($p < 0,001$; $\chi^2 = 50,731$). В основной группе удалось достичь 1-летней выживаемости у 35 (100 %), 2-летней – у 9 (27 %), 3-летней – у 1 (3 %) пациента.

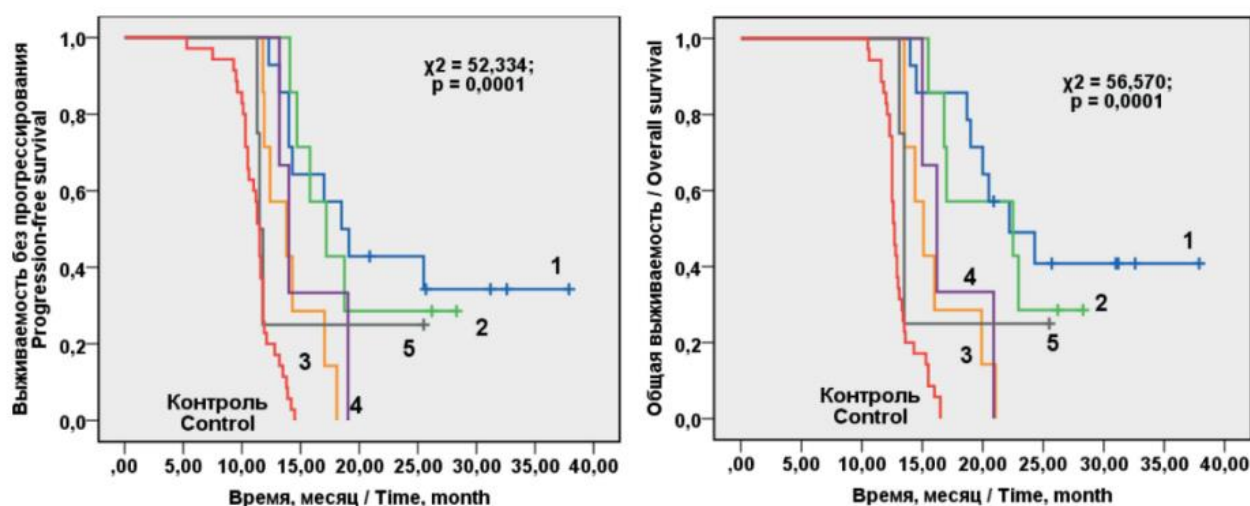


Рис. 1. Выживаемость без прогрессирования (слева) и общая выживаемость (справа) в исследуемых группах по методу Каплана–Майера

В группе контроля показатели двух- и трехлетней выживаемости не получены, срок одного года после завершения лечения пережили 29 (87 %) больных, у остальных ($n = 6$) пациентов продолжительность жизни менее 1 года. В основной группе даже при разделении на подгруппы, в зависимости от получаемой комбинации цитостатиков, отмечены значимые различия по сравнению с пациентами контрольной группы, которым проводилась эмпирически назначенная схема FOLFOX. Наилучшая выживаемость наблюдалась у пациентов ($n = 14$), получавших персонализированно назначенную схему FOLFIRI с интраперитонеальным введением цисплатина. Из них 6 больных живы и находятся под наблюдением, в том числе 5 – без признаков прогрессирования. Медиана общей выживаемости в этой подгруппе, составила 22,2 (15,9–28,4) мес. По данным литературы, медиана общей выживаемости больных РЖ с ПК без лечения составляет 5,6 мес; при системной химиотерапии без циторедукции – 10,2 мес; после циторедуктивных операций в комбинации с системной химиотерапией (в нашем исследовании это группа контроля) – 12,7 мес. Таким образом, медиана ОВ (18,7 мес) по результатам нашего исследования выше, чем в группе контроля и при описанных в мировой литературе исследованиях (CRS + HIPEC). Кроме того, пациенты, персонализированно получавшие схему FOLFIRI с интраперитонеальным введением цисплатина, имели еще большую выживаемость – 22,2 (15,9–28,4) мес.

Заключение

Разработанный метод лечения рака желудка с перитонеальным канцероматозом на основе анализа уровня экспрессии генов химиочувствительности и ABC-транспортеров позволяет улучшить отдаленные результаты комбинированного лечения в виде значимого увеличения медианы ВБП и ОВ.

Список литературы

1. Маркович В.А., Тузиков С.А., Родионов Е.О., Попова Н.О., Цыганов М.М., Миллер С.В., Подолько Д.В., Цыденова И.А., Ибрагимова М.К., Литвяков Н.В. Комбинированное лечение больных раком желудка IV стадии с канцероматозом брюшины // Сибирский онкологический журнал. – 2023. – Т. 22 (1). – С. 24–34. – doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-1-24-34.

УДК 2788

Сравнительное исследование влияния генно-модифицированных каллусных клеток моркови, содержащих рекомбинантную щелочную фосфатазу человека, и пробиотика лебенина на восстановление количества лактобактерий при экспериментальном дисбактериозе

Ю.В. Чекусова, В.В. Быков, Н.В. Гуркин

Научный руководитель: профессор, д.м.н., заслуженный работник ВШ РФ А.И. Венгеровский
Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России,
Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050
ООО «Инновационные фармакологические разработки»,
Россия, г. Томск, ул. Елизаровых, 79/4, 634021
E-mail: preclin8_dep@iphar.ru

Comparative research of the effect of genetically modified carrot callus containing recombinant human alkaline phosphatase and the probiotic lebenin on the quantitative recovery of viable lactobacillus in experimental dysbiosis

Y.V. Chekusova, V.V. Bykov, N.V. Gurkin

Scientific Supervisor: Prof., Dr., A.I. Vengerovskii
Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovskii Trakt str., 2, 634050
Innovative Pharmacology Research LLC, Russia, Tomsk, Elizarovykh str., 79/4, 634021
E-mail: preclin8_dep@iphar.ru

Abstract. *The effect of genetically modified carrot callus containing recombinant human alkaline to recovery the quantitative of viable lactobacillus in experimental dysbiosis has been studied. In animals treated with genetically modified carrot callus containing recombinant human alkaline, the number of viable bacteria was $128.5 \pm 2.6 \log 10$ CFUs per gram of feces of the day, which is lower than in intact animals, but higher than in the control animal group. Only in this animal group lactobacilli were detected throughout the experiment. The ability of genetically modified carrot callus containing recombinant human alkaline to prevent a total decrease in the quantitative of viable lactobacillus in the intestine may help reduce the severity of side effects of antibiotic therapy.*

Key words: *dysbiosis, lactobacillus, carrot callus cells, lebenin, alkaline phosphatase.*

Введение

Кишечник – сложный и значимый биотоп в организме человека. Его слизистая оболочка – связующее звено между разными системами организма. Микробиота кишечника – ключевой фактор в поддержании гомеостаза. Во взрослом возрасте у здоровых людей кишечник преимущественно заселен четырьмя основными типами микроорганизмов: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Verrucomicrobia* [1]. Снижение количества представителей нормальной флоры ведет к увеличению проницаемости кишечной стенки и попаданию бактериальных эндотоксинов в системный кровоток, что приводит к местному и системному воспалению. Изменение количественного и качественного состава микрофлоры, а также усиление ее инвазивности и агрессивности – всё это приводит к такому состоянию, как дисбактериоз [2]. Уменьшение количества жизнеспособных лактобактерий существенно влияет на качество жизни человека, замедляет метаболизм лактозы, и, как следствие, вызывает диарею, так как пусковым механизмом является дисахаридазная недостаточность [3].

Дисбактериоз кишечника – нарушение саморегуляции кишечной микробиоты, приводящее к дисбалансу количества и состава кишечных бактерий. Дисбактериоз развивается под действием различных факторов, в том числе при антибиотикотерапии, и вовлечен в патогенез множества патологических состояний, включая диарею, воспалительные заболевания кишечника, метаболический синдром, ожирение и рак. ЛПС, АТФ и некоторые

другие нуклеозидфосфаты (ингибиторы роста микробиоты) могут стать причиной развития дисбактериоза, поскольку ингибируют рост кишечной микрофлоры, являясь частью механизма отрицательной саморегуляции [4].

Кишечная щелочная фосфатаза – изофермент, вырабатываемый энтероцитами, и один из представителей семейства изоферментов щелочной фосфатазы (APs). Кишечная щелочная фосфатаза участвует в дефосфорилировании бактериального липополисахарида, снижает его антигенные свойства, уменьшает локальное воспаление, проницаемость кишечника и системные иммунотропные эффекты [5].

В качестве источника кишечной щелочной фосфатазы разрабатывается продукт, представляющий собой генно-модифицированные каллусные клетки моркови, содержащие рекомбинантный ген кишечной щелочной фосфатазы человека (шифр – ЩФ-М).

Цель настоящей работы – изучить способность ЩФ-М восстанавливать количество лактобактерий в кишечнике у мышей с экспериментальным дисбактериозом в сравнении с действием пробиотика лебенина.

Экспериментальная часть

Эксперимент проводили на 24 мышах самках стока CD-1 (4 группы по 6 особей в каждой). Дисбактериоз у мышей моделировали введением в желудок антибиотика широкого спектра действия ампициллина в дозе 500 мг/кг 1 раз в день на протяжении 7 дней [6]. На фоне индукции дисбактериоза и в течение 14 дней после индукции животные группы 3 *ad libitum* потребляли смесь полнорационного гранулированного корма и ЩФ-М (соотношение 1:1 по массе), доза щелочной фосфатазы на животное составляла около 100 ЕД. В эти же дни животным группы 4 вводили в желудок препарат позитивного контроля пробиотик лебенин в эффективной дозе 42 мг/кг. Животные всех групп, включая контрольную (группа 2, дисбактериоз без лечения) и интактную (группа 1, без дисбактериоза), имели свободный доступ к корму и воде. Ежедневно с первого дня эксперимента в фекалиях животных определяли количество лактобактерий для оценки влияния испытуемых веществ на восстановление представителя нормальной микрофлоры кишечника в динамике.

Статистическую обработку проводили программой Statistica 8.0 с использованием критерия Манна-Уитни как наиболее подходящего для малых выборок ($n < 10$). Для наглядности рассчитывали десятичный логарифм количества колониеобразующих единиц в 1 г фекалий в сутки ($\lg \text{КОЕ/г} \times \text{сут}$).

Результаты

По окончании эксперимента у животных контрольной группы количество лактобактерий, выраженное в виде десятичного логарифма площади под кривой ($103,02 \pm 1,22 \text{ КОЕ/г фекалий} \times \text{сут}$), было практически в 2 раза ниже показателя в интактной группе ($190,6 \pm 0,4 \text{ КОЕ/г фекалий} \times \text{сут}$) ($p < 0,05$). У животных, получавших ЩФ-М, данный показатель составил $128,5 \pm 2,6 \text{ КОЕ/г фекалий} \times \text{сут}$, что ниже, чем у интактных животных, но выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Аналогичный показатель у мышей, получавших лебенин, составил $119,5 \pm 1,1 \text{ КОЕ/г фекалий} \times \text{сут}$. По действию на данный показатель эффект ЩФ-М превосходил таковой у лебенина в указанных экспериментальных условиях ($p < 0,05$) (рис.1).

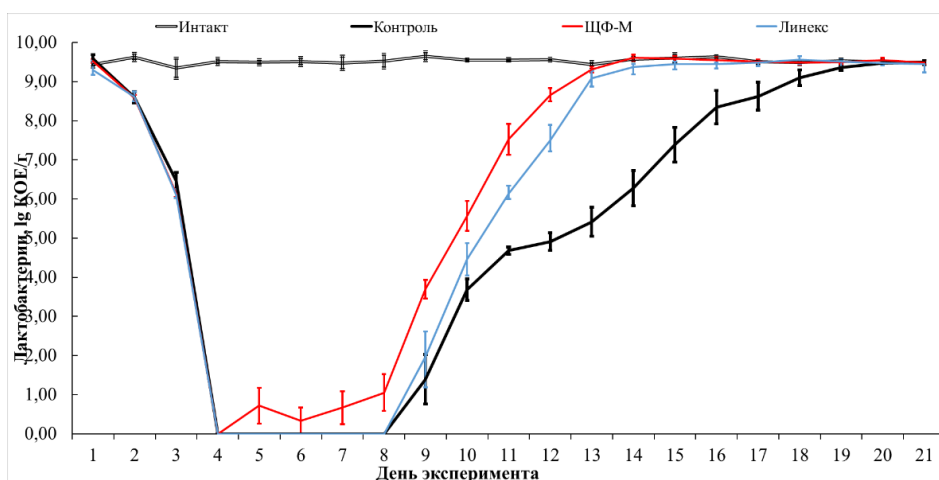


Рис. 1. Динамика изменения количества лактобактерий

При этом лишь у животных, получавших ЩФ-М, лактобактерии были определены на протяжении всего эксперимента, в том время как в группе с лебенином с 4-го по 8-й день их не обнаруживали, как и у контрольных животных. В контрольной группе нормализация количества лактобактерий произошла к 18-му дню ($\lg \text{КОЕ/г}$, $p > 0,05$). Восстановление микробиоты на фоне повреждающего эффекта антибиотика под действием ЩФ-М началось с 7-го дня и рост лактобактерий достиг устойчивого уровня уже к 13-му дню эксперимента в сравнении с показателем интактной группы ($\lg \text{КОЕ/г}$, $p > 0,05$). В группе с лебенином рост количества лактобактерий начался только после отмены антибиотика (с 9-го дня), а нормализации показатель достиг лишь к 15-му дню эксперимента ($\lg \text{КОЕ/г}$, $p > 0,05$).

Заключение

Пребиотический эффект ЩФ-М начинает проявляться уже на фоне действия антибиотика широкого спектра действия ампициллина, что определяет более быстрое восстановление микрофлоры кишечника по сравнению с действием пробиотика лебенина, а также статистически значимо быстрее приводит к восстановлению количества лактобактерий до нормы. Способность ЩФ-М не допускать тотального снижения количества лактобактерий в кишечнике может способствовать уменьшению выраженности побочных эффектов антибиотикотерапии.

Список литературы

1. Юдина Ю.В., Корсунский А.А., Аминова А.И. Микробиота кишечника как отдельная система организма // Доказательная гастроэнтерология. – 2019. – № 8 (4–5). – С. 36–43.
2. Kühn, F. Intestinal alkaline phosphatase targets the gut barrier to prevent aging // JCI Insight. – 2020. – Vol. 5, № 6. – P. 34–60.
3. Shi Y. Structural and Functional Alterations in the Microbial Community and Immunological Consequences in a Mouse Model of Antibiotic-Induced Dysbiosis // Front. Microbiol. – 2018. – Vol. 9, № 1948. – P. 43–54.
4. Santos, G.M.; Ismael, S.; Morais, J. Intestinal alkaline phosphatase: a review of this enzyme role in the intestinal barrier function // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10, № 746. – P. 2–16.
5. Lee K.E., Kim J.K., Kim D.H. Orally Administered Antibiotics Vancomycin and Ampicillin Cause Cognitive Impairment With Gut Dysbiosis in Mice With Transient Global Forebrain Ischemia // Front. Microbiol. – 2020. – Vol. 11. – P. 2–14.
6. Malo M.S., Moaven O., Muhammad N. Intestinal alkaline phosphatase promotes gut bacterial growth by reducing the concentration of luminal nucleotide triphosphates // Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. – 2014. – Vol. 306, № 10. – P. 826–838.

УДК 616-092

**Оценка концентрации лептина у пациентов с хронической обструктивной
болезнью легких, осложненной метаболическим синдромом**

Н.А. Чернышов, Д.А. Проконич

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

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

E-mail: voronkova-ov@yandex.ru

**Features of leptin production in patients with chronic obstructive
pulmonary disease complicated by metabolic syndrome**

N.A. Chernyshov, D.A. Prokonich

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

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

E-mail: voronkova-ov@yandex.ru

Abstract. *The study conducted a comparative assessment of serum leptin concentrations in patients with chronic obstructive pulmonary disease and in combination with metabolic syndrome. According to the results of the study, it was found that the level of leptin in the blood serum increases in patients with chronic obstructive pulmonary disease, regardless of the presence of metabolic syndrome, which makes it possible to characterize leptin as a general inflammatory mediator mediating the development of inflammatory reactions unrelated to metabolic disorders.*

Key words: *adipokines, metabolic syndrome, metabolic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease.*

Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является одной из ведущих причин смертности, уступая лишь онкологическим и сердечно-сосудистым заболеваниям [1]. Основными факторами риска развития ХОБЛ являются генетическая предрасположенность, воздействие на слизистую дыхательных путей табачного дыма и других поллютантов, респираторные инфекции и др.

В настоящее время довольно широко распространена коморбидность ХОБЛ и метаболического синдрома (МС), а метаболические нарушения и ожирение рассматриваются как один из возможных факторов риска развития ХОБЛ [2]. Помимо механического влияния избытка жировой ткани на функциональное состояние бронхолегочной системы важная роль в развитии респираторных нарушений отводится системной воспалительной реакции, формирующейся на фоне метаболической дисрегуляции адипоцитов висцеральной жировой ткани [3]. Как известно, именно этот вид жировой ткани обладает выраженной метаболической активностью, продуцируя большое количество разнообразных цитокинов (TNF- α , IL-1, 6, 8 и др.), адипокинов и других биологически активных веществ [4]. Адипокины принимают непосредственное участие в формировании системного воспаления, некоторые из них (лептин, резистин, висфатин) проявляют провоспалительные свойства, другие же (адипонектин) обладают противовоспалительным эффектом [5].

Нарушение баланса между провоспалительными и противовоспалительными адипокинами приводит к развитию системной воспалительной реакции, которая в свою очередь индуцирует формирование локального воспаления в бронхолегочной системе и формирование респираторных нарушений, а также увеличивает риск возникновения обострений при уже сформированной патологии. Определение гормональной активности жировой ткани необходимо с точки зрения более глубокого понимания механизмов формирования морфофункциональных нарушений в бронхолегочной системе на фоне МС, а

также прогнозирования клинических исходов у пациентов с коморбидностью ХОБЛ и МС. Поэтому целью нашего исследования являлась сравнительная оценка концентрации лептина у пациентов с изолированной ХОБЛ и осложненной МС.

Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие больные ХОБЛ, которые были разделены на 2 группы: пациенты с изолированной ХОБЛ ($n = 10$, $60,8 \pm 3,1$ лет, индекс массы тела (ИМТ) $21,9 \pm 2,2$ кг/м²) и пациенты с ХОБЛ, осложненной МС ($n = 16$, средний возраст $64,6 \pm 2,1$ лет, ИМТ $30,7 \pm 2,4$ кг/м²). Контрольную группу ($n = 8$) составили здоровые добровольцы сопоставимые по полу и возрасту.

Диагностика ХОБЛ проводилась согласно Клиническим рекомендациям Российского респираторного общества (2021 г.). Диагностика составляющих метаболического синдрома проводилась согласно рекомендациям Всероссийского научного общества кардиологов (2013 г.).

Материалом для исследования служила венозная кровь, взятая натощак. Кровь в объеме 7 мл отбиралась в вакутейнер с активатором свертывания для получения сыворотки. В сыворотке крови определяли концентрацию лептина методом твердофазного иммуноферментного анализа («сэндвич»-вариант) с использованием набора «Leptin ELISA» (Diagnostics Biochem Canada Ink., Канада).

Статистическую обработку данных проводили при помощи программы STATISTICA 13. Проверку на соответствие данных закону нормального распределения проводили при помощи критерия Шапиро-Уилка. Данные представляли в виде медианы (Me) и межквартильного интервала (Q_{25} ; Q_{75}). Дальнейший анализ различий между группами проводили при помощи критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Лептин является пептидным гормоном, основное физиологическое действие которого заключается в регуляции пищевого поведения. Этот гормон, связываясь с рецепторами, расположенными в гипоталамусе, стимулирует выработку нейропептидов, подавляющих аппетит. При ожирении наблюдается повышение уровня лептина в крови, что связано с развитием лептинорезистентности и повышенной выработкой данного гормона адипоцитами висцеральной жировой ткани. Лептин продуцируется не только клетками жировой ткани, но также Т-лимфоцитами, базофилами и, предположительно, клетками моноцитарно-макрофагального ряда, и играет важную роль в возникновении и поддержании воспалительных процессов в различных органах и системах организма [6, 7]. Роль лептина при различных патологиях достаточно хорошо описана в научной литературе, так, например, при МС и ожирении уровень гиперлептинемии коррелирует с частотой развития сердечно-сосудистых осложнений. Высокая концентрация лептина способствует повышению гиперреактивности бронхов, а, следовательно, является фактором развития бронхиальной астмы и обострений при ХОБЛ [8–10].

По результатам проведенного нами исследования было выявлено статистически значимое повышение концентрации лептина у всех пациентов с ХОБЛ, независимо от наличия МС. Так, у пациентов с изолированной ХОБЛ концентрация лептина была повышена в среднем в 2,2 раза ($p = 0,005$), а у пациентов с коморбидностью ХОБЛ и МС уровень лептина был выше в среднем в 1,5 раза ($p = 0,018$) по сравнению со здоровыми добровольцами (таблица 1).

Таблица 1

Концентрации лептина в сыворотке крови у больных осложненной и неосложненной ХОБЛ Me (Q_{25} ; Q_{75})

Показатель	Пациенты с ХОБЛ ($n = 10$)	Пациенты с ХОБЛ и МС ($n = 16$)	Здоровые добровольцы ($n = 8$)
Лептин, нг/мл	14,31 (9,248;19,49)*	9,565 (7,254;22,77)*	6,363 (4,741;7,798)

Примечание: *статистически значимые различия по сравнению с группой здоровых добровольцев ($p < 0,05$)

Заключение

Повышение концентрации лептина в сыворотке крови у пациентов с ХОБЛ, независимо от наличия МС, позволяет предположить значимость лептина как неспецифического биомаркера системной воспалительной реакции, а повышение концентрации лептина может рассматриваться как один из патогенетических факторов типового патологического процесса воспаления.

Список литературы

1. Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Айсанов З.Р. и др. Хроническая обструктивная болезнь легких: федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению // Пульмонология. – 2022. – Т. 32, № 3. – С. 356–392.
2. Вютрих К.А., Куколь Л.В., Лазик В.В. Хроническая обструктивная болезнь легких и метаболический синдром: состояние проблемы (литературный обзор) // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина. – 2017. – Т. 12, № 1. – С.18–30.
3. Овсянников Е.С., Авдеев С.Н., Будневский А.В. Системное воспаление у больных хронической обструктивной болезнью легких и ожирением // Терапевтический архив. – 2020. – Т 92, № 3. – С. 13–18.
4. Kahn C.R., Wang G., Lee K.Y. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome // Journal of Clinical Investigation. – 2019. – Vol. 129, № 10. – P. 3990–4000.
5. Taylor E.B. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity // Clinical Science. – 2021. – Vol. 135, № 6. – P. 731–752.
6. Wang S, Baidoo S.E., Liu Y. et al. T cell-derived leptin contributes to increased frequency of T helper type 17 cells in female patients with Hashimoto's thyroiditis // Clinical and Experimental Immunology. – 2013. – Vol. 171, № 1.
7. Suzukawa M., Nagase H., Ogahara I. et al. Leptin Enhances Survival and Induces Migration, Degranulation, and Cytokine Synthesis of Human Basophils // The Journal of Immunology. – 2011. – Vol. 186, № 9. – P. 5254–5260.
8. Будневский А.В., Малыш Е.Ю., Овсянников Е.С. и др. Бронхиальная астма и метаболический синдром: клинико-патогенетические взаимосвязи // Терапевтический архив. – 2015. – Т. 87, № 10. – С. 110–114.
9. Вербовой А.Ф., Вербовая Н.И., Долгих Ю.А. Ожирение – основа метаболического синдрома // Ожирение и метаболизм. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 142–149.
10. Родионова Л.В., Плеханова Н.Г., Богданов Д.Ю. и др. Содержание адипокинов в сыворотке крови у лиц различного сердечно-сосудистого риска // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2017. – № 4. – С. 77–82.

УДК 58.04

**Влияние воздействия наночастиц оксида цинка на энергию прорастания
и всхожесть семян *Sinapis alba***В.Р. Чжоу, Л.Ю. Иванова, О.В. Бакина

Научный руководитель: к.т.н., Л.Ю. Иванова

Институт физики прочности и материаловедения СО РАН,

Россия, г. Томск, пр. Академический, 2/4, 634055

E-mail: anlu009@rambler.ru**Effect of zinc oxide nanoparticles exposure on germination energy
and germination of *Sinapis alba* seeds**V.R. Chzhou, L.Yu. Ivanova, O.V. Bakina

Scientific Supervisor: Ph.D., L.Yu. Ivanova

Institute of Strength Physics and Materials Science, Russia, Tomsk, Akademicheskii str., 8/2, 634055

E-mail: anlu009@rambler.ru

Abstract. Nanotechnologies make a significant contribution to the agriculture development. In present study the effect of zinc oxide nanoparticles on the *Sinapis alba* seed germination in concentration from 0.01 to 0.1 mg/mL was studied. It was found that the use of zinc oxide nanoparticles has a stimulating effect on germination. The increase in germination energy with increasing nanoparticle concentration was observed. Seed germination in the control group on the 6th day was 88 %. Seed germination in groups treated with nanoparticles at concentrations of 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL and 0.1 mg/mL was 93.5 %, 96 %, 98.5 % respectively All seeds had seedling leaves.

Key words: zinc oxide nanoparticles, *Sinapis alba*, germination.

Введение

Население планеты ежегодно сталкивается с проблемой недостатка продовольствия. По данным ФАО, к 2050 году необходимо нарастить мощности производства на 50 % [1]. Новые технологии, включая нанотехнологии, могут внести значительный вклад в улучшение глобального снабжения населения продовольствием. Наночастицы (НЧ) находят широкое применение в различных отраслях, включая медицину, промышленность, биотехнологии и сельское хозяйство (с/х). В с/х НЧ используются для улучшения роста с/х культур, увеличения урожайности и качества продукции, борьбы с вредителями и для улучшения питательных свойств почвы [2]. Так, например, НЧ цинка, меди, железа и их оксидов в концентрации до 2,0 мг/мл, оказывали благоприятное воздействие на энергию прорастания и всхожесть семян пшеницы, ячменя, ржи, редиса, горчицы и других социально значимых культур [3].

Однако, существуют противоречивые представления о механизме взаимодействия НЧ с растениями. В связи с этим, активно изучаются процессы поглощения, перемещения, накопления, биотрансформации и токсичности НЧ. Замечено, что доза НЧ имеет большое значение. Даже небольшие концентрации НЧ могут увеличить рост растений, по сравнению с растениями, не подвергавшимися такому воздействию, в то время как большие концентрации могут тормозить развитие [4].

Нами было изучено влияние НЧ оксида цинка (ZnO) в концентрациях от 0,01 до 0,1 мг/мл, на прорастание семян белой горчицы *Sinapis alba*. Горчица *Sinapis alba* является наиболее важной с/х культурой, используемой в качестве лекарственного, кормового, медоносного растения и сидерита для оздоровления пахотных земель.

Материалы и методы исследования

НЧ ZnO синтезировали методом химического осаждения из нитрата цинка $Zn(NO_3)_2$ гидроксидом калия. Для исследования морфологии НЧ ZnO использовали просвечивающую электронную микроскопию (JEM 100 CX II, JEOL, Япония).

Семена горчицы *Sinapis alba* были получены в компании ООО «ЭкоСад» (г. Барнаул, Россия). Предпосевная обработка проводилась по методике [5]. Водную суспензию НЧ ZnO в концентрации 0,01 мг/мл, 0,05 мг/мл и 0,1 мг/мл получали механическим смешиванием НЧ с водой. Оценку влияния НЧ на энергию прорастания и лабораторную всхожесть белой горчицы проводили по ГОСТ 12038-84. Для этого семена проращивали в темноте в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной 5 мл водной суспензии НЧ различной концентрации. В качестве контроля использовали дистиллированную воду. В каждую чашку раскладывали по 50 семян. Семена, помещенные на увлажненное ложе, выдерживали при температуре (5 °C–10 °C) в течение 3 суток. Затем семена выдерживали при температуре 30 °C в течение 6 часов, после чего проращивали при 20 °C. Энергию прорастания определяли на 4-е сутки экспозиции, учет всхожести семян – на 6-е сутки. Все эксперименты проводили в четырехкратно.

Результаты

По данным просвечивающей электронной микроскопии установлено, что НЧ ZnO преимущественно собраны в агломераты размером до 500 нм, средний размер частиц составил 98 ± 2 нм (рис. 1).

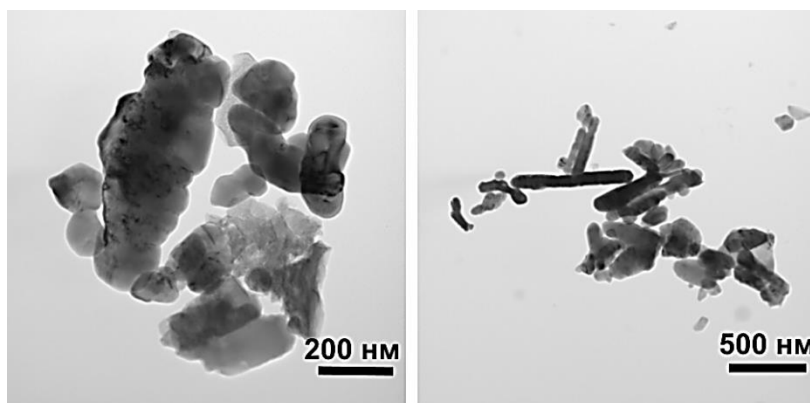


Рис. 1. ПЭМ изображения наночастиц ZnO, полученные при различном увеличении

Общие результаты всхожести семян приведены на рисунке 2. Семена белой горчицы проросли на 4-е сутки эксперимента в течение первых 12 часов после помещения семян в тепло. Наибольшей энергией прорастания обладали семена на увлажненном ложе, содержащем 0,1 мг/мл НЧ ZnO (93,5 % взошедших семян и 19,5 % семян с семядольными листьями). При этом энергия прорастания семян увеличивалась с ростом массовой доли НЧ ZnO. Вместе с тем на 4-е сутки эксперимента семена на ложе, содержащем 0,01 мг/мл НЧ ZnO имели меньшую скорость роста корешка, чем семена из выборки контроля. Данная тенденция сохранялась на 6-е сутки эксперимента на фазе роста семядольных листочков (рис. 3).

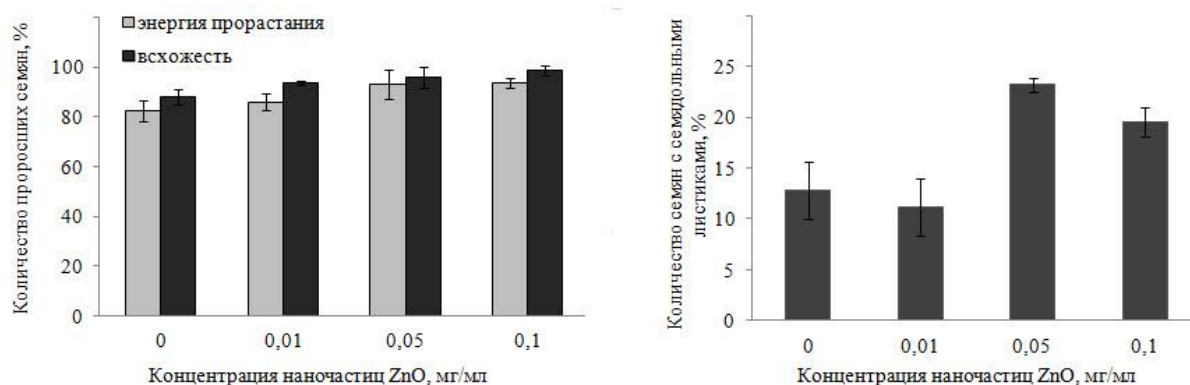


Рис. 2. Результаты всхожести семян: а) энергия роста и всхожесть на 6-е сутки, б) количество семян с семядольными листиками на 4-е сутки

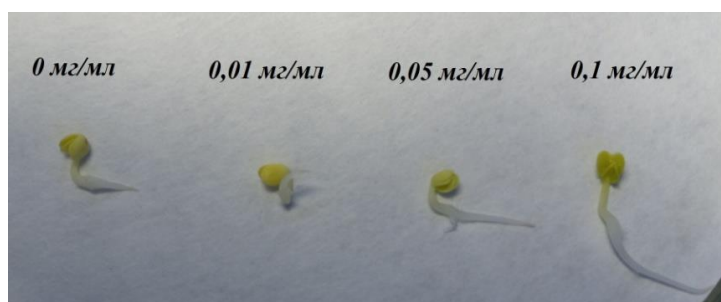


Рис. 3. Развитие корневой системы белой горчицы с НЧ ZnO в различной концентрации

Всхожесть семян на 6-е сутки составила: в группе контроля – 88 %, в группах содержащих НЧ: 0,01 мг/мл – 93,5 %; 0,05 мг/мл – 96 %; 0,1 мг/мл – 98,5 %. Все всходы имели семядольные листики.

Выводы

Установлено, что применение суспензии НЧ ZnO в концентрации 0,1 мг/мл оказывает стимулирующее действие на всхожесть белой горчицы *Sinapis alba*. В то же время, суспензия НЧ 0,01 мг/мл приводила к затормаживанию развития корневой и листовой системы, при незначительном увеличении количества проросших семян (на 4 % по сравнению с контрольной группой).

Работа выполнена в рамках государственного задания ИФПМ СО РАН, тема FWRW-2021-0007.

Список литературы

1. Santás-Miguel V. et al. Use of metal nanoparticles in agriculture. A review on the effects on plant germination // Environmental Pollution. – 2023. – С. 122222.
2. Kornarzyński K. et al. Effect of Fe₃O₄ nanoparticles on germination of seeds and concentration of elements in *Helianthus annuus* L. under constant magnetic field // Scientific Reports. – 2020. – Т. 10, № 1. – С. 8068.
3. Santás-Miguel V. et al. Use of metal nanoparticles in agriculture. A review on the effects on plant germination // Environmental Pollution. – 2023. – С. 122222.
4. Bayat M. et al. Ameliorating Seed Germination and Seedling Growth of Nano-Primed Wheat and Flax Seeds Using Seven Biogenic Metal-Based Nanoparticles // Agronomy. – 2022. – V. 12, № 4. – P. 811.
5. Sarkhosh S. et al. Effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on seed germination characteristics in two Brassicaceae family species: *Camelina sativa* and *Brassica napus* L // Journal of Nanomaterials. – 2022. – V. 2022. – P. 1–15.

УДК 578.52:578.834.1

**Разработка комплексного протокола молекулярно-генетических исследований
SARS-CoV-2 содержащих образцов**

А.К. Чистякова, Е.А. Степанова

Научный руководитель: чл.-корр. РАН, д.б.н., И.Н. Исакова-Сивак

Институт экспериментальной медицины,

Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, 197376

E-mail: anna.k.chistiakova@gmail.com

**Development of the complex protocol for molecular genetic analysis
of SARS-CoV-2 containing samples**

A.K. Chistiakova, E.A. Stepanova

Scientific Supervisor: corr. member of RAS, Dr., I.N. Isakova-Sivak

Institute of Experimental Medicine, Russia, Saint-Petersburg, Akademika Pavlova str., 12, 197376

E-mail: anna.k.chistiakova@gmail.com

Abstract. *Although the COVID-19 pandemic has been announced as no longer a global public health emergency, new genetic variants of SARS-CoV-2 are continuing to appear. Therefore, the development of test systems for the detection of different coronavirus variants remains relevant. In the present study, we developed a system which allows performing a complex molecular genetic analysis of SARS-CoV-2 containing samples, by using modern molecular methods including qRT-PCR, Sanger sequencing and pyrosequencing.*

Key words: *Coronavirus, SARS-CoV-2, COVID-19, qRT-PCR, Sanger sequencing, Pyrosequencing*

Введение

Коронавирус SARS-CoV-2 характеризуется высокой изменчивостью [1]. Проведение исследований SARS-CoV-2 требует разработки протоколов, позволяющих оперативно и с высокой точностью определить наличие вирусного материала в образце, провести его идентификацию, а в отдельных случаях – иметь в распоряжении методики, позволяющие проводить мониторинг замен в отдельных позициях.

Целью данной работы являлась разработка и апробация системы молекулярно-генетических исследований SARS-CoV-2-содержащих образцов с применением технологий qRT-PCR, сэнгеровского секвенирования и пиросеквенирования.

Экспериментальная часть

В исследовании использовались образцы, содержащие коронавирус SARS-CoV-2. Использовали вирусный материал сублиний альфа, бета, гамма, дельта, омикрон, накопленный на культуре клеток Vero E6, а также материал, полученный из соскобов эпителиальных клеток лиц с подтвержденным диагнозом COVID-19. Все манипуляции с вирусосодержащим материалом до его обеззараживания производились в условиях бокса биобезопасности BSL-3. РНК выделяли набором реагентов «Биолабмикс» (Набор для выделения РНК на колонках, Биолабмикс, Россия) по инструкции производителя. ОТ-ПЦР в реальном времени производили набором Евроген One-tube ОТ-ПЦР микс по протоколу производителя. ПЦР ставили по следующему протоколу: 50 °C 20 минут, 95 °C 1 минута, далее 40 циклов: 95 °C 15 секунд, 55 °C 20 секунд, 72 °C 30 секунд с детекцией сигнала. Результаты реакции анализировали в программе QuantStudio™ Design and Analysis Software. Для постановки ОТ-ПЦР использовали набор реагентов БиоМастер ОТ-ПЦР–Color (Биолабмикс, Россия) с комплектом специфических праймеров (температура отжига 55 °C). Разделение фрагментов производили с помощью электрофореза в агарозном геле с последующей очисткой Cleanup Mini BC023L (Евроген, Россия). Постановку реакции синтеза

фрагментов для сэнгеровского секвенирования проводили с помощью BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific, США). Секвенирование производилось с использованием автоматического капиллярного секвенатора ABIPrism 3130xl (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя. Пиросеквенирование выполняли с использованием PyroMark Q24 (Qiagen, США). Детали пробоподготовки и выполнения исследования были ранее опубликованы [2].

Результаты

Протокол ОТ-ПЦР в реальном времени был разработан нами для быстрого определения подтипа вируса в специфических экспериментах, в которых мы использовали вирусы SARS-CoV-2 подтипов гамма и дельта, а также референсный вариант вируса. В одну реакцию добавляли три зонда, работающие по принципу конкурентного замещения (табл. 1). В отдельных реакциях с данными зондами наблюдалась неспецифическая гибридизация зондов на менее специфичную матрицу из-за высокой гомологии последовательности. Сочетание сигнала от разных зондов позволяет отличить дельта и гамма варианты коронавируса, а также другие варианты, характеризующиеся сочетанием замен L18F, T20N или T19R. Также данные зонды по отдельности могут быть использованы для детекции вирусов, относящихся к сублиниям, перечисленным в таблице 1, при титровании на клеточной культуре.

Таблица 1

Список олигонуклеотидов и гибридизационных зондов, специфичных к участку S-гена SARS-CoV-2, для детекции вируса методом ОТ-ПЦР в реальном времени

Праймер	Последовательность	Вариант SARS-CoV-2
F	GTTTTCTTGTTTTATTGCCACTA	
R	TGTAAACTGAGGATCTGAAACT	
Зонд 1	/ROX/-AATTTTACAAACAGAACTCAATTACCCCTCT-/BHQ-2/	Gamma
Зонд 2	/HEX/-AATCTTAGAACCAGAACTCAATTACCCCT-/BHQ-1/	Delta
Зонд 3	/6-FAM/-AATCTTACAACCAGAACTCAATTACCCCT-/BHQ1/	Wuhan, Alpha, Omicron BA.1

Последовательности вируса в образцах контролировались с помощью секвенирования методом Сэнгера. Нами был разработан протокол для определения последовательности двух белков коронавируса – белка шипа (S) и нуклеокапсидного белка (N). Были созданы наборы олигонуклеотидов, амплифицирующие разделенные на фрагменты S и N гены коронавируса SARS-CoV-2. После предварительного тестирования разных сочетаний праймеров и отработки ПЦР была выбрана оптимальная схема, позволяющая специфично амплифицировать ряд перекрывающихся фрагментов для расшифровки полной последовательности генов S и N вируса SARS-CoV-2 (табл. 2). По разработанному протоколу была верифицирована последовательность S и N генов коллекционных штаммов, использованных в качестве модельных при отработке протоколов генотипирования, а также определена последовательность S и N генов ряда изолятов вирусов, выделенных в Санкт-Петербурге в течение 2020–2023 годов.

Таблица 2

Праймеры, амплифицирующие фрагменты S, N генов SARS-CoV-2, и праймеры для секвенирования

Ген	Праймер ОТ-ПЦР	Последовательность	Длина участка	Секвенирующий праймер	Последовательность
S-1	F (-233)	AAGGGGTACTGCTGTTATGT	1223	F (-233)	AAGGGGTACTGCTGTTATGT
				R1081	AGTTGCTGATTCTCTTCCTGT
	R1081	AGTTGCTGATTCTCTTCCTCC		F235	TTTGATAACCCTGTCCTACCA
		TGT		R652	GAGGGAGATCACGCACTAA

S-2	F757	GATTCTTCTTCAGGTTGG ACAG	938	R1695	AAATTGTTGGAAAGGCAGAA
	R1695	AAATTGTTGGAAAGGCA GAA		R1081	AGTTGCTGATTCTCTTCCTGT
				R1487	CCATATGATTGTAAAGGAAA GTAA
S-3	F1627	CAATGGTTTAAACAGGCAC AGG	1003	R2056	TACGTGCCCGCCGAGGAG
	R2631	CAGTGCAGAAGTGTATTG AGC		F2070	ATCCATCATTGCCTACACTAT
				R2631	CAGTGCAGAAGTGTATTGAG C
				F1769	GTTCTTTTGGTGGTGTCA GTG TT
S-4	F2423	ATCCATCAAAACCAAGC AAGAGG	1494	F2423	ATCCATCAAAACCAAGCAAG AGG
				F2910	TGGTGCAATTTCAAGTGTTT
				F3359	CATTTGTGTCTGGTAACTGTG A
	R3917	AACAAAATCTGAAGGAG TAGCAT		R3176	CCATGAGGTGCTGACTGAG
				F2793	TGGCAAAATTCAAGACTCAC
N-1	F (-146)	GGGTAGTCTTGTAGTGCG TTGTTCG	908	F (-146)	GGGTAGTCTTGTAGTGCGTT GTTCG
	R762	AAGCCTCAGCAGCAGAT TTC		R762	AAGCCTCAGCAGCAGATTTTC
				R386	GCCGTCTTTGTTAGCACCAT
N-2	F512	CTACGCAGAAGGGAGCA GAG	777	F512	CTACGCAGAAGGGAGCAGAG
	R1289	GCCCATCTGCTTTGTGT		R1289	GCCCATCTGCTTTGTGT

При необходимости более глубокого анализа состава популяции по отдельным нуклеотидным позициям (например, в экспериментах по адаптации вируса к воздействию моноклональных антител, либо анализу эволюции вируса в животных моделях) мы применяем разработанные нами ранее [1] протоколы анализа с использованием пиросеквенирования на PyroMark Q24. Для определения чувствительности к смешанным популяциям мы провели дополнительную серию экспериментов, в ходе которых детектировали компоненты в смеси с известным соотношением исходных вирусов. Пиросеквенирование также было успешно применено нами для анализа близкородственных штаммов сублинии Omicron, которая доминирует на сегодняшний день.

Заключение

Нами был разработан и апробирован комплекс протоколов молекулярно-генетического анализа содержащих SARS-CoV-2 образцов, позволяющий производить обнаружение вируса методом ОТ-ПЦР в реальном времени, определять последовательность его S и N генов методом сэнгеровского секвенирования, а также проводить быстрое генотипирование и анализ состава замен в отдельных участках S гена методом пиросеквенирования. В комплексе разработанные методики позволяют проводить детализированный мониторинг генетической последовательности SARS-CoV-2 в процессе выполнения экспериментов.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-30003).

Список литературы

1. Markov P.V., Ghafari M., Beer M., et al. The evolution of SARS-CoV-2 // Nature Reviews Microbiology. – 2023. – Vol. 21, № 6 – P. 361–379.
2. Чистякова А.К., Степанова Е.А., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г. Разработка протоколов генотипирования разных вариантов коронавируса SARS-CoV-2 методом пиросеквенирования // Медицинский академический журнал. – 2022. – Т. 22, № 2. – С. 97–114.

УДК 616.89-008.441.13-055.26:612.82-053.13

Влияние хронической внутриутробной алкоголизации и хронической внутриутробной гипоксии на морфометрические показатели сосудов микроциркуляторного русла головного мозга плодов человекаС.Н. Шумилова

Научный руководитель: профессор, д.м.н., А.В. Солонский
Научно-исследовательской институт психического здоровья ТНИМЦ РАН
Россия, г. Томск, ул. Алеутская, 4, 634014
E-mail: sofashumilova97@gmail.com

The influence of chronic intrauterine alcoholization and chronic intrauterine hypoxia on the morphometric parameters of the vessels of the microvasculature of the human fetuses brainS.N. Shumilova

Scientific supervisor: Prof., Dr., A.V. Solonsky
Research Institute of Mental Health TNICM RAS, Russia, Tomsk, Aleutskaya str., 4, 634014
E-mail: sofashumilova97@gmail.com

Abstract. *Intrauterine alcohol intoxication has a significant impact on the intrauterine development of nervous tissue and can lead to mental pathologies in the future. The most likely pathogenetic mechanism causing these adverse effects may be intrauterine hypoxia. According to the results of the study, morphometric changes characterizing the nervous tissue that developed under conditions of chronic intrauterine alcoholization and chronic intrauterine hypoxia have a number of similar features. There is a decrease in vessel density per mm². There is also a tendency to reduce the size of blood vessels. In the group, HYPOXIA, however, was not statistically confirmed.*

Key words: *alcohol, hypoxia, intrauterine development, microvasculature vessels.*

Введение

Согласно современным представлениям, воздействие этанола во внутриутробном периоде может оказывать ряд неблагоприятных эффектов на развитие нервной системы. В случае хронической алкоголизации материнского организма у детей отмечается высокий уровень психопатологий, включая экстернализацию и интернализацию поведения, нарушения сна, аномальные привычки и стереотипы, а также проблемы управления поведением, даже при отсутствии задержки психомоторного развития. Данные изменения сохраняются и у взрослых, проявляясь расстройствами, связанными со злоупотреблением психоактивных веществ, расстройствами личности, психотическими расстройствами, состояниями повышенной тревожности и нарушением пищевого поведения [1].

Механизмы, опосредующие данные изменения до сих пор являются предметом пристального внимания научного сообщества. Наиболее вероятной причиной может являться развитие внутриутробной гипоксии вследствие этаноловой интоксикации во внутриутробном периоде. Это связано с тем, что этанол является доказанным вазоактивным агентом и может приводить к нарушению фетоплацентарного кровотока. Это проявляется повышением фетоплацентарного сосудистого сопротивления и вазоконстрикторную реактивность на ангиотензин II [2].

Также, значимым механизмом патологического воздействия этанола на развитие сосудистой системы нервной ткани может являться нарушение ангиогенеза вследствие снижения уровней белка рецептора VEGF (Фактор роста эндотелия сосудов) типа 2. Кроме того, воздействие может ингибировать вызванную глутаматом мобилизацию кальция в эндотелиальных клетках и влиять на пластичность и способствует гибели сосудов МЦР, приводя к снижению их количества и размеров в ткани [3].

Тем не менее, в настоящий момент среди авторов нет однозначного мнения относительно механизмов, обуславливающих тератогенное действие этанола на развивающуюся нервную ткань.

Экспериментальная часть

Образцы головного мозга плодов человека были получены в ходе операций по добровольному искусственному прерыванию беременности в роддомах и гинекологических отделениях больниц г. Томска. Исследование было выполнено с учетом требований этического комитета (№ 8938 от 31.01.2022) и с письменного согласия участниц. Всего было получено 22 образца мозга 10–11 полных недель гестации. Материал был распределен на две группы по две подгруппы в каждой.

В группе АЛКОГОЛЬ было сформировано две подгруппы. Контрольная подгруппа включала 6 образцов, полученных от соматически здоровых женщин, не принимавших алкоголь во время беременности. В основную подгруппу входил материал 6 плодов, полученный от женщин, страдавших алкоголизмом 1–2 стадии и употреблявших от 500 до 800 мл 40 % спиртных напитков. Стаж заболевания варьировался от 3 до 13 лет. Подготовка материала включала фиксацию в 0,5 % растворе глutarового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,3–7,4, дофиксирование в 1 % растворе OsO₄, обезвоживание в спиртах восходящих концентраций и заливку в эпоксидные смолы. Для морфометрии использовали полутонкие срезы.

В группе ГИПОКСИЯ также было сформировано две подгруппы. Контрольная подгруппа включала 6 образцов, полученных от соматически здоровых женщин, не имеющих факторов, предрасполагающих к развитию внутриутробной гипоксии. Основная подгруппа включала 4 образца, от женщин, страдающих заболеваниями, предрасполагающими к развитию внутриутробной гипоксии (в том числе заболевания сердечно-сосудистой, дыхательной системы, сахарный диабет). Подготовка материала включала фиксацию в 9 % растворе нейтрального формалина, обезвоживание в спиртах восходящих концентраций и заливку в парафины. Для морфометрии использовали тонкие срезы.

Окрашивание препаратов проводилось толуидиновым синим по методике Ниссля. Морфометрии подвергались микрофотографии, полученные путем световой микроскопии. В ходе исследования вычислялась медиана площади и периметра МЦР, их плотность на единицу площади среза (1 мм²), а также удельная площадь в процентах.

В ходе статистического анализа в каждой выборке проверялась гипотеза о нормальности распределения (НРЗ). Проверка гипотезы НЗР осуществлялась графическим и расчётным методами. По результатам проверки нормальности закона распределения во всех попарно-сравнимых выборках присутствовал неизвестный закон распределения. Ввиду неизвестного закона распределения, для оценки влияния алкоголя и гипоксии на исследуемые морфометрические структуры использовался непараметрический критерий Манна-Уитни (статистическая значимость при $p < 0,05$).

Результаты

В ходе микроскопического исследования было установлено, что на 10–11 неделе гестации вне зависимости от группы нервная ткань представлена нейробластами, глиобластами, а также сосудами. Для изучаемого срока гестации характерна достаточная дифференцированность сосудов МЦР (рис. 1). Оно включает в себя артериолы, широкую сеть капилляров и венулы. В головном мозге артериолы представлены сосудами с циркулярно расположенными гладкомышечными клетками в стенке. Венулы имеют строение, характерное для безмышечного типа сосудов. В составе их стенок эндотелиоциты с рыхлой соединительнотканной оболочкой. Капилляры представлены сосудами соматического типа и имеют стенку, состоящую из эндотелиоцитов, базальной мембраны, находящихся в её

структуре перицитов, а также расположенных снаружи адвентициальных клеток. В просветах части сосудов отмечаются наличие форменных элементов крови.

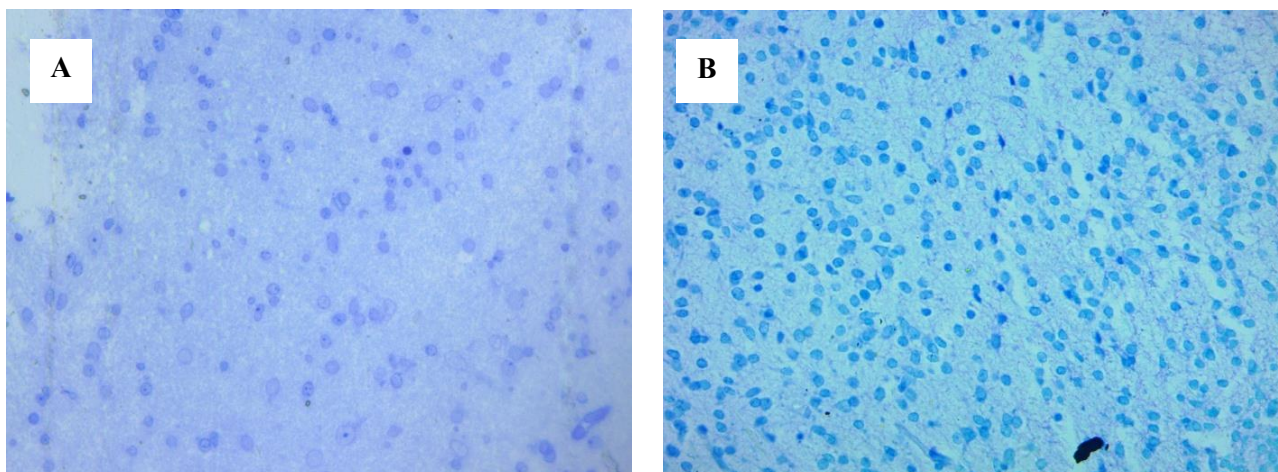


Рис. 1. Головной мозг плода человека 10-11 недель развития. (А) Группа АЛКОГОЛЬ, основная подгруппа. (В) Группа ГИПОКСИЯ, основная подгруппа. Окраска толуидиновым синим по Нислю. Увеличение $\times 400$

Морфометрический анализ и сопоставление данных сосудов МЦР продемонстрировали, что для группы АЛКОГОЛЬ характерно достоверное уменьшение средних размеров (то есть, площадей и периметров) сосудов, а также уменьшение их количества на мм^2 в основной подгруппе по сравнению с контрольной. В группе ГИПОКСИЯ была выявлена аналогичная динамика. Было выявлено уменьшение показателей плотности на мм^2 в основной подгруппе по сравнению с контрольной. Медианные значения размеров сосудов также продемонстрировали уменьшения в ткани, развивавшейся в условиях хронической внутриутробной гипоксии. Однако, достоверных различий с контролем в размерах установлено не было.

Заключение

Таким образом, было установлено, что воздействие таких неблагоприятных факторов, как хроническая внутриутробная алкоголизация и хроническая внутриутробная гипоксия, приводят к изменениям развития сосудов МЦР. Отмечается тенденция к уменьшению как размеров, так и количества сосудов. Данные изменения могут стать причиной нарушения трофики и оксигенации ткани головного мозга и, как следствие, нарушения миграции и дифференцировки нейробластов и глиобластов.

Список литературы

1. Georgieff M.K., Tran P.V., Carlson E.S. Atypical fetal development: Fetal alcohol syndrome, nutritional deprivation, teratogens, and risk for neurodevelopmental disorders and psychopathology // *Dev Psychopathol.* – 2018. – Vol. 30, № 3. – P. 1063–1086.
2. Jakoubek V., Hampl V. Alcohol and fetoplacental vasoconstrictor reactivity // *Physiol Res.* – 2018. – Vol. 17, № 3. – P. 509–513.
3. Jégou S., El Ghazi F., de Lendeu P.K., Marret S., Laudenbach V., Uguen A., Marcorelles P., Roy V., Laquerrière A., Gonzalez B.J. Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain // *Ann Neurol.* – 2012. – Vol. 72. – P. 952–960.

Научное издание

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Том 4. Биология и фундаментальная медицина

Сборник научных трудов
XXI 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