



**Биомаркеры пульпита:
системный анализ
молекулярной
патофизиологии
Захарян А.Г. и соавт.
3-11**

**Снижение витальности
опухолевых клеток
ведет к
усилению их
тромбогенных свойств
Корнейчук А.Д.,
Колесникова И.С.
12-17**

**Флуориметрические
методы анализа
взаимодействий между
молекулами
Лифшиц И.А.
18-24**

**Роль тромбоцитарных
микроРНК при раке
молочной
железы
Усова В.А.,
Дремук И.А.
25-29**

**Основные подходы в
конструировании
микрофлюидных камер
для анализа системы
гемостаза
Шумко А.Д.,
Давыденко А.И.
30-37**

Содержание

1. А.Г. Захарян, Э.В. Величко, А. Канаев, В.С. Формузал Биомаркеры пульпита: системный анализ молекулярной патофизиологии.....3
2. А.Д. Корнейчук, И.С. Колесникова Снижение витальности опухолевых клеток ведет к усилению их тромбогенных свойств.....12
3. И.А. Лифшиц Флуориметрические методы анализа взаимодействий между молекулами.....18
4. В.А. Усова, И.А. Дремук Роль тромбоцитарных микроРНК при раке молочной железы25
5. А.Д. Шумко, А.И. Давыденко Основные подходы в конструировании микрофлюидных камер для анализа системы гемостаза.....30

Биомаркеры пульпита: системный анализ молекулярной патофизиологии

Biomarkers of pulpitis: systemic molecular analysis of disease pathophysiology

А.Г. Захарян^{1#}, Э.В. Величко², А. Канаев¹, В.С. Формузал¹.

A. G. Zakharyan^{1#}, E.V. Velichko², A. Kanayev¹, V.S. Formuzal¹.

1. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Никитский бульвар 13, Москва, Россия, 119019

2. Кафедра патологической физиологии Института цифрового биодизайна и искусственного интеллекта в медицине ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Автор для переписки: zakharyan_a_g@student.sechenov.ru

1. Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Nikitski boulevard 13, Moscow, Russia, 119019

2. Pathophysiology Department, Institute of Digital Biodesign and Artificial Intelligence in Medicine I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 13-1 Nikitsky Boulevard, 119019 Moscow, Russia

Получено: 07.10.2025

Принято к публикации: 29.11.2025

Опубликовано: 30.12.2025

EDN: HUUGPK

DOI: 10.65189/2949-0758-2025-4-2-3-11

Аннотация

Пульпит является одним из самых распространённых заболеваний, возникающих, как правило, как осложнение кариеса. Ранняя диагностика пульпита и способность моделировать реактивные свойства пульпы позволят предупредить эндодонтическое удаление пульпы. Этому способствует поиск биомаркеров, определение которых позволяет разрабатывать прогрессивные методы лечения и ранней диагностики заболевания ещё на обратимых стадиях. Целью данного систематического обзора является суммирование имеющихся современных исследований, посвященных определению и изучению динамики биомаркеров пульпита на основании анализа межклеточного матрикса, крови и десневой жидкости. Обзор написан согласно Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA). Для поиска информации использовались данные научных баз и электронных научных библиотек PubMed, Cyberleninka, Google Scholar, Elibrary, CORE (Core. ak.uk). Отбор публикаций строго соответствовал выбранным критериям включения. Результаты: получено подтверждение отрицательной тенденции в развитии стандартизации протоколов проведения исследований в области биомаркеров пульпита. Предложено частично ограничить спектр исследуемых биомаркеров пульпита по признаку высокой функциональной плеотропности. Рекомендовано чрезмерно не акцентировать внимание на таких биомаркерах пульпита,

как MMP-9, IL-3, IL-13. Выявлена способность TNF- α сигнализировать об полноценности и завершении регенеративных процессов в пульпе, что может быть использовано при планировании благоприятных прогнозов щадящего лечения. Заключение: при использовании метода анатомической сегрегации областей забора пробы из кровеносных сосудов пульпы (из коронкового и/или корневого отделов) возможно повышение диагностической эффективности определения биомаркеров пульпита, что также связано с унификацией исследования биологической жидкости, состав которой анализируется.

Ключевые слова: Пульпит; Биомаркеры.

Annotation

Pulpitis is one of the most common diseases, usually occurring as a complication of caries. Early diagnosis of pulpitis and the ability to model the reactive properties of the pulp will prevent endodontic pulp removal. This is facilitated by the search for biomarkers, the identification of which allows the development of progressive methods of treatment and early diagnosis of the disease at reversible stages. The aim of this systematic review is to summarize the available modern studies devoted to the identification and study of the dynamics of pulpitis biomarkers based on the analysis of the intercellular matrix, blood, and gingival fluid. The review was written in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA). Scientific databases and electronic scientific libraries

PubMed, Cyberleninka, Google Scholar, Elibrary, and CORE (Core.ak.uk) were used to search for information. The selection of publications strictly complied with the selected inclusion criteria. Results: confirmation of a negative trend in the development of standardization of research protocols in the field of pulpitis biomarkers was obtained. It was proposed to partially limit the range of pulpitis biomarkers studied due to their high functional pleiotropy. It is recommended not to place excessive emphasis on pulp biomarkers such as MMP-9, IL-3, and IL-13. The ability of TNF- α to signal the completeness and completion of regenerative processes in the pulp has been identified, which can be used when planning favorable prognoses for conservative treatment. Conclusion: When using the method of anatomical segregation of sample collection areas from pulp blood vessels (from the coronal and/or root sections), it is possible to increase the diagnostic effectiveness of determining pulpitis biomarkers, which is also associated with the unification of the study of biological fluid, the composition of which is analyzed.

Key words: Pulpitis; Biomarkers.

Введение

Пульпит является одним из самых распространённых заболеваний, возникающих, как правило, как осложнение кариеса [1–3]. На ранних стадиях пульпит обратим, так как пульпа способна к регенерации в условиях локального воспалительного процесса [4]. Однако в клинической практике пульпит чаще диагностируется уже на необратимой стадии, что служит причиной экстирпации пульпы (депульпированию) вследствие утраты жизнеспособности её клеток [5,6].

В последние годы интерес к поиску маркеров патологических процессов возрос, так как они позволяют обеспечивать более глубокое понимание механизмов заболеваний [7]. Субъективность современных традиционных клинических методов ещё в 1970-х годах породила идею молекулярного подхода в эндодонтии у Cohen J. S. et al. (1985), которые начали исследовать простагландины в патологической ткани пульпы [8]. Ранняя биомаркерная детекция пульпита на обратимых стадиях позволит избежать полного ее удаления, а также заложит основы для активации регенерационной способности клеток пульпы [9]. На данный момент клинических исследований по поиску биомаркеров и систематических обзоров очень малое количество, не позволяющее объективно судить о консенсусных индикаторах заболевания. Фундаментальный мета-анализ, проведенный Karrar R. N. et al. (2023), включающий напечатанные в среднем до 2010 года публикации, акцентирует внимание на несоответствии скорости появления последней

информации о роли и динамике изменений различных биомаркеров в биологических жидкостях от момента выполнения исследования до выхода статьи [10]. Научная работа Останиной Д.А. и соавторов (2020) показала как несостоятельность методов сбора биологической жидкости, так и необходимость ограничения спектра принимаемых к рассмотрению биомаркеров [11]. Похожие выводы встречаются и в других статьях, опубликованных с разницей в три года, где подчеркивается необходимость проведения исследований в рамках современных тенденций в медицине и обязательное внесение изменений в целях рационализации методов, которые должны соответствовать моменту проведения научной работы, быть близкими к эталонному протоколу, который встречается среди публикаций последних 5 лет.

Несмотря на уже опубликованные литературные обзоры, систематическая оценка современных данных, посвящённая биомаркерам пульпита, с критическим анализом методов стандартизации отсутствует. Целью данного систематического обзора является не только суммирование и анализ результатов опубликованных научных исследований, соответствующих последним знаниям о биомаркерах пульпита, но и синтез и интеграция различных исследований как с теоретической, так и практической значимости для извлечения наиболее ценных выводов, являющихся ориентиром для проведения дальнейших исследований.

Материалы и Методы

Систематический обзор был написан согласно требованиям Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) [12]. Протокол обзора зарегистрирован в базе PROSPERO, регистрационный номер CRD420251229721.

Данное исследование проводилось по методологии PICO для ответа на исследовательский вопрос: «Имеется ли корреляция между биомаркерами пульпита и его клиническими проявлениями?», где популяция (P) это «постоянные зубы человека с обратимым и необратимым пульпитом, вызванным глубоким кариозным поражением»; вмешательство (I) «измерение концентрации биомаркеров при различных стадиях заболевания»; сравнение (C) «показатели контрольной группы пациентов без кариеса»; результат (O) «получение значений корреляции биомаркеров с различными стадиями пульпита».

Критерии включения:

- 1) наблюдательные исследования

(поперечные, случай-контроль, когортные) или клинические исследования (с данными до/после лечения);

2) лица не старше 80 лет (когда регенеративные процессы могут быть замедлены ввиду возраста);

3) наличие в статье клинических данных: оценки степени поражённости (обратимый/необратимый пульпит, некроз) - или гистологических данных: формирование дентинного мостика, инфильтрация, обнаружение инфламсомы;

4) приведение числовых статистических и нестатистических данных (количество участников, средние, стандартные отклонения, p-value)

5) работы опубликованные на английском и русском языках.

Критерии исключения:

1) обзоры, мета-анализы, письма в редакцию, тезисы конференций без полных данных, исследования *in vitro* без проведения *in vivo*;

2) пациенты с системными заболеваниями;

3) наличие вредных привычек: курение и алкоголизм (если нет сегментации);

4) неуточнённые методы анализа и отсутствие корреляции уровня биомаркеров и клинических данных.

Электронный поиск был произведён двумя независимыми авторами (З.А., К.А.) с использованием баз научных медицинских данных и электронных научных библиотек: PubMed, Cyberleninka, Google Scholar, Elibrary, CORE (Core.ak.uk). Ключевые слова и MeSH-термины «Dental Pulp», «Dentinal Tubule», «Dental Pulp Necrosis», «Pulpitis», «Pulpotomy», «Regeneration», «Guided Tissue Regeneration», «Biomarkers» использовались в различных комбинациях с использованием логических операторов. Стратегия поиска строилась на создании концептов и объединении их в общий поисковый запрос. К рассмотрению были приняты статьи, опубликованные с 2021 года по 2025 год, отражающие последние, современные данные, соответствующие критериям поиска. Помимо этого, изучалась библиография исследований для выявления пропущенных статей. Все подходящие статьи импортировались в приложение Zotero (7.0.24 (64-bit)), где удалялись все дубликаты.

При дальнейшем отборе использовалась двухфазная методика: двое независимых экспертов (З. А. и Ф. В) вначале изучали название статей и их краткое содержание (абстракт), затем приступали к ознакомлению с текстом исследования. При возникновении разногласий они решались путем привлечения ещё одного специалиста (К. А), в ходе проведения дискуссии приходили к определенному мнению. Двухфазный

отбор проходил в веб-приложении Rayan.

Экстракция данных проходила с привлечением всех авторов данного исследования. Для создания Таблиц было использовано приложение Microsoft Excel (Microsoft Office 2016; Microsoft, Redmond, WA). В шильдике таблицы экстракции данных включены: автор/год, дизайн исследования, характеристика групп в исследовании (количество участников, возраст, пол), тип клинических данных, тип биомаркера, выводы.

Оценка исследований на «предвзятость» (risk of bias) проводилась согласно представленному дизайну исследования: рандомизированные клинические исследования проверялись при помощи системы Cochrane Risk of Bias 2 (RoB 2), для наблюдательных исследований поперечного типа использовался Newcastle–Ottawa scale (NOS), для остальных наблюдательных исследований использовался Risk Of Bias In Non-randomised Studies (ROBINS) [13–15].

Анализ встречаемости и синтез данных. После проведения экстракции данных было выявлено положительное направление изменения воспалительных биомаркеров при различных степенях развития пульпита (нормальная пульпа, обратимый/необратимый пульпит). Высокий уровень неоднородности окончательно принятых к рассмотрению и анализу исследований (когортные, поперечные, рандомизированные) и малое количество статей (n=7) не позволяет сделать мета-анализ клинически важным и научно обоснованным. Проведение анализа встречаемости биомаркера в исследованиях проводилось таким образом, что встречаемость засчитывалась только при статистически подтверждённой корреляции биомаркера с обратимой или необратимой стадией пульпита (p<0,05). Также был проведён качественный синтез данных, сфокусированный на согласованности результатов между исследованиями.

Большинство статей, посвященных изучению биомаркеров пульпита, указывает на значимое повышение спектра воспалительных индикаторов, что нужно рассматривать со стороны потенциальной публикационной предвзятости. Однако малое количество данных не позволяет провести тест Эггера и большинство других статистических тестов ввиду неоднородности биомаркеров и отсутствия данных в оригинальных научных исследованиях.

Результаты

Отбор исследований.

Результаты отбора исследований представлены на Рисунке 1. Изначально запрос включал в себя 1103 статьи, из которых согласно

критериям исключения автоматическими фильтрами были убраны 1042 работы. Оставшиеся публикации (61 статья) были проанализированы и соотнесены с выбранными критериями, в результате чего из них к рассмотрению оставлены 12 статей. Полный доступ к тексту выявлен был к 7 публикациям. Эти 7 статей включают в себя 2 рандомизированных исследования, 1 когортное и 4 кросс-секционных исследований. Полученные данные из статей были занесены в Таблицу 1 (таблица экстракции данных).



Рисунок 1. Диаграмма этапов поиска литературы.

Оценка качества статей на риск статистической предвзятости.

Оценка качества статей показала низкий риск систематической предвзятости у 2 рандомизированных исследований, умеренный риск у наблюдательных исследований, однако в большинстве наблюдательных исследований сложно контролировать все конфаундерные факторы (например, отсутствие указания на сопоставимость групп по возрасту). Результаты оценки статей на риск статистической предвзятости представлены в Таблице 2.

Анализ встречаемости биомаркеров.

По результатам анализа встречаемости биомаркеров, стоит отметить MMPs и IL, которые преобладают среди всех остальных молекул. Основные результаты представлены на Рисунке 2.

Обсуждение и заключение

Современные диагностические модели опираются на клиническую чувствительность пульпы, что является достаточно неточной метрикой, обладающей низкой специфичностью и при этом высоким уровнем субъективности [23]. Электроодонтометрия не учитывает васкуляризационный фактор и не имеет дифференциально диагностического значения, имея чувствительность 0,72 и точность 0,82 [24–

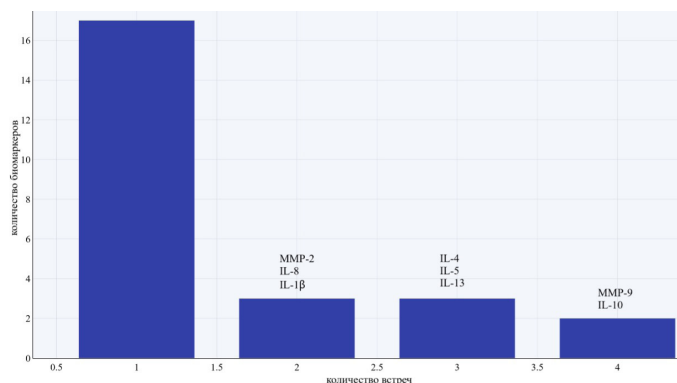


Рисунок 2. Иллюстрировано распределение биомаркеров по встречаемости в анализируемых исследованиях.

26]. Доплеровская флоуметрия и пульсоксиметрия этой зоны не являются общедоступными методами, хоть и имеют высокую чувствительность. Сравнительная характеристика различных методов, построенная на основе данных Mainkar A. et al. (2018) представлена на Рисунке 3.

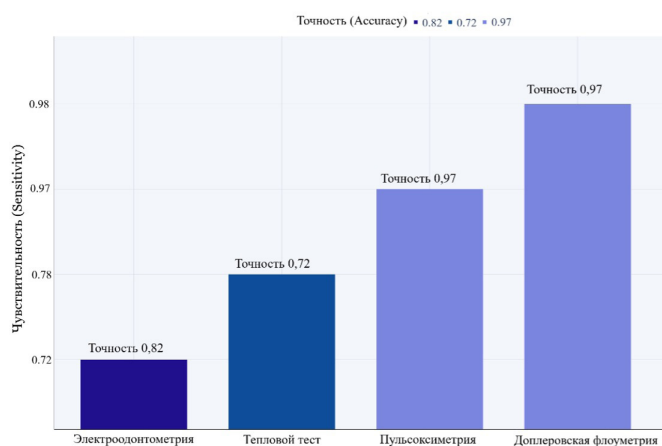


Рисунок 3. Демонстрация чувствительности, точности различных методов диагностики при лечении пульпита.

Разработка более точного и объективного теста позволит повысить эффективность консервативной терапии, так как появится возможность дифференцировать состояния, при которых традиционные методы часто дают ложноположительно или ложноотрицательные результаты. Именно биомаркеры являются главными молекулярными индикаторами с высокой специфичностью диагностики, основанной на анализе межклеточного матрикса, крови, десневой жидкости [27–29]. Таблица экстракции данных выявляет ряд перспективных биомаркеров, коррелирующих с клиническими стадиями пульпита. Особенно важно заметить, что Th2-ассоциированный интерлейкин IL-4 показал способность к дифференциальной диагностике пульпита в нескольких статьях. Показатель этого цитокина статистически значимо ($p=0.0078$) повышался в коронковой пульпе при ассимптоматическом и симптоматическом пульпите, тогда как в других исследованиях подобной анатомической сегрегации не наблюдалось. Например, в научных работах Li Q.

et al. (2025), Loo A. L. S. J. et al. (2025) сообщается о повышении IL-4 ($p < 0.05$) при необратимом пульпите.

Данное методологическое противоречие не позволяет объективно судить об индикаторной способности IL-4 и ставит под сомнения валидность сравнения данных.

Помимо проблем стандартизации, аналитическая интерференция обусловлена выявленной несостоятельностью некоторых биомаркеров. Loo A. L. S. J. et al. (2025), ссылаясь на работу Heneu D. и Whicher J. T. (1995), постулируют невалидность использования в диагностике IL-3, IL-10, IL-12 ввиду их возможного связывания экссудатом или белками [20, 30]. Вопреки этой догме, в ряде независимых исследованиях получают статистически значимые результаты. Li Q. et al. (2025) выделяет IL-10 как биомаркер для прослеживания границы перехода обратимого в необратимый пульпит (AUC=0,69 со 100% специфичностью), а Altaie A. M. et al. (2021) представили повышение IL-10 при периапикальном абсцессе. Louzada L. M. et al. (2024) также утверждает о диагностической способности цитокина [19]. Такие критические расхождения в фундаментальных положениях ставят под сомнение валидность целого пласта результатов многолетних исследований.

Особое положение среди цитокинов занимает IL-1 β , который не менее чем в двух исследованиях показал себя в качестве консенсусного биомаркера (Loo et al. (2025) и Louzada et al. (2024)), что патогенетически обосновано пиропототическими изменениями при пульпите [31]. Тем не менее, диагностическая ценность практически нивелируется уже ранее упомянутыми методологическими расхождениями. Диагностическая способность при отличии обратимого и необратимого пульпита наблюдается при понижении концентрации цитокина в корневой пульпе ($p < 0,05$), что снова указывает на анатомический градиент, не учитываемый в иных исследованиях.

Накопленные данные о роли IL-1 β свидетельствуют о существовании парадокса: широкая функциональная плеотропность обуславливает низкую специфичность в контексте дифференциальной диагностики. Ведь, например, наблюдается увеличение экспрессии интерлейкина при экспериментальном нокауте генов противовоспалительных молекул [32] или его экзосомально-опосредованное влияние на боль после пульпита [33] приводит к уменьшению значимости показателя этого цитокина в диагностике пульпита.

Аналогичное ограничение распространяется и на TNF- α , который в более ранних исследованиях определяют как потенциальный биомаркер при

диагностике пульпита, а в более поздних найдены утверждения о его возможном участии в процессах регенерации [34]. TNF- α в исследовании Loo A. L. S. J. et al. (2025) на ранних этапах уже показал снижение и при обратимом, и при необратимом пульпите [20]. Это может стать основанием для стимуляции процессов регенерации и повышении количества сохраненных жизнеспособных клеток пульпы после выполнения пульпотомии.

Высокий интерес к матриксным металлопротеиназам подтверждается их присутствием в 4 исследованиях из выборки. В работе Sharma et al. представлены результаты корреляции активной формы MMP-9 в крови пульпы после пульпотомии с ее успешностью и с симптоматическим необратимым пульпитом, что затрагивает именно коронковую часть пульпы. Однако данные результаты вступают в фундаментальное противоречие с работами Sabeti M.A et al. (2024) и Loo, Ai Leen Shu Jen et al. (2025), в которых регистрируются локальные повышения концентрации MMP-9 в коронарной крови интактных зубов [35]. Это ставит под сомнение использование MMPs как биомаркеров, так как они способны участвовать в различных процессах, а соответственно не только в патологических [36]. Это снова актуализирует проблему функциональной плеотропности. Более того, учёт многофакторности влияний на экспрессию генов MMPs позволяет рассматривать изменения вторичными, ведь, например, еще Shin, Su-Jung et al. (2002) показали влияние TNF- α на концентрацию MMPs [37].

Ограничения

Результаты оценки риска предвзятости и малое количества статей не позволяет точно интерпретировать результаты ввиду гетерогенности использованных молекул, методов анализа, протоколов осуществления исследования. Это подтверждает острую необходимость в стандартизации и повышении достоверности результатов проведением мультицентровых исследований [38]. Karrar R. N et al. (2023) в своем научном литературном обзоре приходят к таким же выводам. Положительной динамики в стандартизации исследований за 2 года не наблюдается.

Заключение

Опыт анализа отобранных статей позволяет сделать вывод, что использование методов Loo et al, основывавшихся на исследованиях Ricucci et al. (2014) и Ricucci et al. (2019), где производился забор крови из коронковой и корневой пульпы, позволяет повысить диагностическую эффективность проведения анализа, а также стандартизировать биологическую жидкость, из которой берётся проба [39,40].

	Автор, год	Дизайн исследования	Характеристика группы		Клинические параметры	Критерии для определения группы	Биомаркер	Вывод	
			параметр	Контр. группа					Исслед. группа
[16]	Geriban, H. E., Coşulu, D., Öncü, Ö., Durmaz, A., & Kara, E. H. (2024)	параллельное рандомизированное контролируемое исследование	Средний возраст	6.53±1.32		обратимый и необратимый пульпит	контрольная группа: отсутствие чувствительности, тоб < 5 мин., отсутствие расширения периодонтальной связки, исследуемая группа: чувствительность, тоб > 5 мин., расширение промежутка между периодонтальным и связками	MMP-2, MMP-8, MMP-9	MMP-2, MMP-9 показали корреляцию с степенью тяжести пульпита
		количество	21	21 (MTA), 21 (Biodentine)					
		пол	29 м. и 28 ж.						
[17]	Altaie, A. M., Venkateshalam, T., Samarasayake, L. P., Soliman, S. S. M., & Hamoudi, R. (2021)	наблюдательное кейс-контрольное исследование	Средний возраст	от 22 лет до 66		периапикальных абсцессов, киста, периапикальная гранулема, здоровая пульпа	контрольная группа: нет кариеса и пародонтита, исследуемая группа: кариозные поражения зубов, некроз пульпы, признаки периапикальной рентгенопрозрачности и потери костной ткани, а также боль и отёк лица в случаях периапикального абсцесса	MMP-9, IL-8, CYP4F3, VEGF, Palmitic acid, stearic acid, 1-nonadecene	некоторые биомаркеры показали высокий уровень корреляции для определённых случаев
		количество	15 периапикальных абсцессов, 14 кист, 14 периапикальных гранулем, 15 здоровой пульпы						
		пол	37 м. и 21 ж.						
[18]	Bas, A., Derelioglu, S. S., & Laloglu, E. (2024)	рандомизированное исследование	Средний возраст	от 4 до 9 лет		асимптоматический и симптоматический пульпит	случайное распределение на группы, которым предоставлялись различные воздействия	IL-6, IL-8, Presepsin	IL-6, IL-8, Presepsin показали высокий уровень корреляции с воспалением пульпы
		количество	26 MTA, 28 Biodentine™, 27 NeoMTA™, 26 ZOE						
		пол	31 ж. и 36 м.						
[19]	Louzada, L. M., Arruda-Vasconcelos, R., Kearney, M., Yamachi, Y., Gomes, B. P. F. A., & Duncan, H. F. (2024)	наблюдательное кросс-секционное исследование	Средний возраст	37 (±8) IP, 36 (±16) EP, 54 (±10) NP		нормальная пульпа, обратимый и необратимый пульпит	контрольная группа: нет кариеса, обратимый пульпит; пациенты, требующие эндодонтического лечения с небольшой чувствительностью (PAI=1), необратимый пульпит: признаки острой чувствительности с сильной болью, глубокий кариес	TNF-α, IL-10, IL-1β, miR-30a-5p and miR-128-3p	miRNAs показали себя хорошими биомаркерами здоровой и поражённой пульпы
		количество	10 NP, 10 IP, 10 EP						
		пол	21 ж. и 9 м.						
[20]	Loo, A. L. S. J., Cen, R., Wang, J., Wu, Z., Duncan, H. F., Lee, A. H. C., & Zhang, C. (2025)	наблюдательное кросс-секционное исследование	Средний возраст	18–75 лет		нормальная пульпа, обратимый и необратимый пульпит	контрольная группа: нет кариеса (PAI=1), обратимый пульпит; пациенты, требующие эндодонтического лечения с небольшой чувствительностью (PAI=1), необратимый пульпит: признаки острой чувствительности с сильной болью (PAI ≤ 2))	IL-1β, IL-1α, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-22, TGFα, FGF-2, MMP-2; MMP-9 and MMP-10	IL-1β является перспективным в определении обратимости пульпита, TGFα и FGF-2 позволяют сравнивать здоровую и поражённую пульпу
		количество	NP (n=17)	RP (n=13), IP(n=20)					
		пол	50% м. и 50% ж.						
[21]	Sharma, R., Kumar, V., Logani, A., Chawla, A., Mir, R. A., Sharma, S., & Kalaiyani, M. (2021)	когортное корреляционное исследование	Средний возраст	От 16 до 35 лет		нормальная пульпа, необратимый пульпит	контрольная группа: нет кариеса, исследуемая группа: сильное кариозное поражение, затрагивающее пульпу с диагнозом SIP	αMMP-9	Выявлена корреляция между успешностью пульпотомии и концентрацией MMP-9
		количество	NP (n=10)	SIP (n=40)					
		пол	50% м. и 50% ж.						
[22]	Li Q. (2025)	наблюдательное кейс-контрольное исследование	Средний возраст	30 лет NP, 32 года RP, 36 лет IP		нормальная пульпа, обратимый и необратимый пульпит	контрольная группа: здоровые моляры, обратимый пульпит: глубокий кариес дентина, без прямого контакта с пульпой, реакция от слабой до умеренной на термические раздражители, исчезающая в течение 3 секунд, необратимый пульпит: умеренная или сильная спонтанную боль, сохраняющаяся после устранения раздражителя	IL-4, IL-5, IL-10, IL-13	IL-4 and IL-13 показали потенциал к дифференциации NP, а IL-5 позволяет дифференцировать сами патологические группы
		количество	NP (n=45)	RP (n=75), IP (n=41)					
		пол	70.73% ж. в NP, 69.33% ж. в RP и 84.44% ж. в IP						

Таблица 1. Таблица экстракции данных.

Автор	метод	Домен 1	Домен 2	Домен 3	Домен 4	Домен 5	Домен 6	Домен 7	итог
Gerihan et al. [16]	RoB 2.0	низкий	низкий	низкий	низкий	низкий	-	-	низкий
Altaie et al. [17]	NOS	3-Apr	0/2	3-Mar	-	-	-	-	среднее качество
Bas et al. [18]	RoB 2.0	низкий	низкий	низкий	низкий	низкий	-	-	низкий
Louzada et al. [19]	ROBINS	низкий	умеренный	низкий	умеренный	низкий	низкий	умеренный	умеренный
Loo et al. [20]	ROBINS	низкий	умеренный	низкий	умеренный	низкий	низкий	умеренный	умеренный
Sharma et al. [21]	ROBINS	низкий	умеренный	низкий	умеренный	низкий	низкий	умеренный	умеренный
Li et al. [22]	ROBINS	низкий	умеренный	низкий	умеренный	низкий	низкий	умеренный	умеренный

Таблица 2. Результаты анализа на риск статистической предвзятости.

Вклад авторов: концептуализация, методология, визуализация, экстракция: Захарян А. Г.; редакция, концептуализация, методология: Величко Эллина Валериевна; отбор и экстракция данных: Канаев А., Формузал В. С..

Финансирование

Исследование не получало внешнего финансирования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список используемых сокращений

Контрольная группа (контр. группа),

Исследовательская группа (исслед. группа),

n - количество,

МТА - минеральный трёх оксидный агрегат,

IP - необратимый пульпит,

EP, NP - здоровая пульпа,

RP - обратимый пульпит,

tob - время кровотечения,

MMP - матриксные металлопротеиназы,

IL - интерлейкин,

aMMP - активная форма матриксной металлопротеиназы,

miRNA - микроРНК,

CYP4F3 - цитохром P450,

VEGF - фактор роста эндотелия сосудов

Список литературы

1. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors
2. Yu C, Abbott P. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. Aust Dent J
3. Hilton T. Keys to Clinical Success with Pulp Capping: A Review of the Literature. Oper Dent. 2009 г.;34(5):615–25.
4. Iaculli F, Rodríguez-Lozano FJ, Briseño-Marroquín B, Wolf TG, Spagnuolo G, Rengo S. Vital Pulp Therapy of Permanent Teeth with Reversible or Irreversible Pulpitis: An Overview of the Literature. J Clin Med. 11 июль 2022 г.;11(14):4016.
5. Yu J, Jamal M, Garcia-Godoy F, Huang GTJ. Dental Pulp Stem Cell Niche. В: Turksen K, редактор. Tissue-Specific Stem Cell Niche [Интернет]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [цитируется по 27 сентябрь 2025 г.]. с. 163–89. (Stem Cell Biology and Regenerative Medicine).
6. Boutsiouki C, Frankenberger R, Krämer N. Clinical and radiographic success of (partial) pulpotomy and pulpectomy in primary teeth: A systematic review. Eur J Paediatr Dent. декабрь 2021 г.;22(4):273–85.
7. Calciolari E, Donos N. The use of omics profiling to improve outcomes of bone regeneration and osseointegration. How far are we from personalized medicine in dentistry? J Proteomics. 30 сентябрь 2018 г.;188:85–96.
8. Cohen JS, Reader A, Fertel R, Beck M, Meyers WJ. A radioimmunoassay determination of the concentrations of prostaglandins E2 and F2alpha in painful and asymptomatic human dental pulps. J Endod. август 1985 г.;11(8):330–5.
9. Zanini M, Meyer E, Simon S. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. J Endod. июль 2017 г.;43(7):1033–51.
10. Karrar RN, Cushley S, Duncan HF, Lundy FT, Abushouk SA, Clarke M, и др. Molecular biomarkers for objective assessment of symptomatic pulpitis: A systematic review and meta-analysis. Int Endod J. октябрь 2023 г.;56(10):1160–77.
11. Останина ДА, Митронин АВ, Островская ИГ, Митронин ЮА. Обзор молекулярных маркеров

- воспаления пульпы зуба. Эндодонтия Today. 31 июль 2020 г.;18(2):34–40.
12. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JPA, и др. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *J Clin Epidemiol.* октябрь 2009 г.;62(10):e1–34.
 13. Sterne JA, Hernán MA, Reeves BC, Savović J, Berkman ND, Viswanathan M, и др. ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of interventions. *The BMJ.* 12 октябрь 2016 г.;355:i4919.
 14. Sterne JAC, Savović J, Page MJ, Elbers RG, Blencowe NS, Boutron I, и др. RoB 2: a revised tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ.* 28 август 2019 г.;i4898.
 15. The Newcastle–Ottawa Scale (NOS) for Assessing the Quality of Non-Randomized Studies in Meta-Analysis | Request PDF
 16. Gerihan HE, Çoğulu D, Önçağ Ö, Durmaz A, Kuru EH. Assessment of MMP levels in reversible and irreversible pulpitis and a randomized controlled trial comparing clinical success of two different calcium-silicate cements in pulpotomy treatment of primary molars with an 18-month follow-up. *BMC Oral Health.* 30 август 2024 г.;24(1):1020.
 17. AM A, T V, LP S, SSM S, R H. Comparative Metabolomics Reveals the Microenvironment of Common T-Helper Cells and Differential Immune Cells Linked to Unique Periapical Lesions. *Front Immunol.* 2021 г.;12:707267.
 18. Bas A, Derelioglu SS, Laloglu E. Efficacy of proinflammatory cytokines in the clinical and radiographic outcomes of different primary molar pulpotomy agents: a comparative randomised study featuring a novel biomarker for pulpal diagnosis. *BMC Oral Health.* 15 октябрь 2024 г.;24(1):1227.
 19. Louzada LM, Arruda-Vasconcelos R, Kearney M, Yamauchi Y, Gomes BPPA, Duncan HF. Teeth with vital pulps and stage III periodontitis unresponsive to therapy exhibit a pulpal inflammatory profile similar to symptomatic irreversible pulpitis - Louzada - 2024 - International Endodontic Journal - Wiley Online Library
 20. Loo ALSJ, Cen R, Wang J, Wu Z, Duncan HF, Lee AHC, и др. Symptom correlation and spatial distribution of inflammatory mediators in pulpitis—A preliminary study. *Int Endod J.* октябрь 2025 г.;58(10):1565–81.
 21. Sharma R, Kumar V, Logani A, Chawla A, Mir RA, Sharma S, и др. Association between concentration of active MMP-9 in pulpal blood and pulpotomy outcome in permanent mature teeth with irreversible pulpitis – a preliminary study. *Int Endod J.* апрель 2021 г.;54(4):479–89.
 22. Li Q. Diagnostic utility of Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13) in pulpal blood for assessing pulpitis severity. *BMC Oral Health.* 11 апрель 2025 г.;25(1):527.
 23. Chen E, Abbott PV. Dental pulp testing: a review. *Int J Dent.* 2009 г.;2009:365785.
 24. Sui H, Lv Y, Xiao M, Zhou L, Qiao F, Zheng J, и др. Relationship between the difference in electric pulp test values and the diagnostic type of pulpitis. *BMC Oral Health.* 10 июль 2021 г.;21:339.
 25. Mainkar A, Kim SG. Diagnostic Accuracy of 5 Dental Pulp Tests: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Endod.* май 2018 г.;44(5):694–702.
 26. Mejàre IA, Bergenholtz G, Petersson K, Tranæus S. Estimates of sensitivity and specificity of electric pulp testing depend on pulp disease spectrum: a modelling study. *Int Endod J.* январь 2015 г.;48(1):74–8.
 27. Das N. Advancing precision dentistry: the integration of multi-omics and cutting-edge imaging technologies—a systematic review. *Front Dent Med.* 12 июнь 2025 г.;6:1581738.
 28. Liu J, Yang L, Liu D, Wu Q, Yu Y, Huang X, и др. The role of multi-omics in biomarker discovery, diagnosis, prognosis, and therapeutic monitoring of tissue repair and regeneration processes. *J Orthop Transl.* 8 август 2025 г.;54:131–51.
 29. Kabbashi S, Roomaney IA, Chetty M. Bridging the gap between omics research and dental practice. *BDJ Open.* 4 март 2024 г.;10:16.
 30. Heney D, Whicher JT. Factors affecting the measurement of cytokines in biological fluids: implications for their clinical measurement. *Ann Clin Biochem.* июль 1995 г.;32 (Pt 4):358–68.
 31. Wei X, Ran S, Yan X, Huang J, Xue L, He TC, и др. Pyroptosis in Pulpitis. *J Inflamm Res.* 30 апрель 2025 г.;18:5867–79.
 32. Lu WL, Zhang L, Song DZ, Yi XW, Xu WZ, Ye L, и др. NLRP6 suppresses the inflammatory response of human periodontal ligament cells by inhibiting NF-κB and ERK signal pathways. *Int Endod J.* 2019 г.;52(7):999–1009.
 33. Zhang J, Yu Z, Wang M, Kang X, Wu X, Yang F, и др. Enhanced exosome secretion regulated by microglial P2X7R in the medullary dorsal horn contributes to pulpitis-induced pain. *Cell Biosci.* 22 февраль 2025 г.;15(1):28.
 34. Kawashima N, Okiji T. Characteristics of inflammatory mediators in dental pulp inflammation and the potential for their control. *Front Dent Med.* 6 август 2024 г.;5:1426887.
 35. Sabeti MA, Nikghalb KD, Pakzad R, Fouad AF. Expression of Selected Inflammatory Mediators with Different Clinical Characteristics of Pulpal Inflammation. *J Endod.* 1 март 2024 г.;50(3):336–43.
 36. Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol.* декабрь 2002 г.;37(6):375–536.
 37. Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod.* апрель 2002 г.;28(4):313–5.
 38. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci.* 2 февраль 2021

г.;22(3):1480.

39. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF. Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. J Endod. декабрь 2014 г.;40(12):1932–9.
40. Ricucci D, Siqueira JF, Li Y, Tay FR. Vital pulp therapy: histopathology and histobacteriology-based guidelines to treat teeth with deep caries and pulp exposure. J Dent. июль 2019 г.;86:41–52.

Снижение витальности опухолевых клеток ведет к усилению их тромбогенных свойств

Decreased vitality of tumor cells leads to an enhancement of their thrombogenic properties

А.Д. Корнейчук^{1,2#}, И.С. Колесникова¹.

A. D. Korneichuk^{1,2,#}, I.S. Kolesnikova¹.

1. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый МЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия

2. ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва, Россия

Автор для переписки: korneichuk.ad18@physics.msu.ru

1. Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 30 Sred-nyaya Kalitnikovskaya st., Moscow, 109029, Russia

2. Dmitry Rogachev National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, 1 Samory Mashela st., Moscow, 117997, Russia

Получено: 06.11.2025

Принято к публикации: 23.11.2025

Опубликовано: 30.12.2025

EDN: SPLYET

DOI: 10.65189/2949-0758-2025-4-2-12-17

Аннотация

Тромбоциты способны экранировать циркулирующие опухолевые клетки от иммунного ответа организма, способствуя гематогенному метастазированию некоторых солидных опухолей, однако, механизмы данного взаимодействия изучены не до конца. Данный процесс моделируется *in vitro* в феномене агрегации тромбоцитов, индуцируемой опухолевыми клетками. Для агрегации тромбоцитов в данных условиях необходимо присутствие плазмы крови, обеспечивающей окружение для развертывания каскада генерации тромбина по внешнему пути от тканевого фактора, который экспрессируется на поверхности большинства опухолевых клеток. В ходе предыдущих экспериментов было установлено, что на агрегацию тромбоцитов предположительно может влиять жизнеспособность, или витальность, опухолевых клеток, зависящая от условий инкубации. Целью данной работы является исследование влияния условий инкубации опухолевых клеток на их способность индуцировать агрегацию тромбоцитов в присутствии плазмы *in vitro*.

Ключевые слова: Тромбоциты, Опухолевые клетки, Витальность клеток, Рак-ассоциированный тромбоз.

Annotation

It is known that platelets are capable of shielding circulating tumor cells from the body's immune response, promoting hematogenous metastasis of some solid tumors. However, the mechanisms of this interaction are not yet fully understood. This process can be modeled *in vitro* through the phenomenon of tumor cell-induced platelet aggregation (TCIPA). For platelet aggregation to occur under these conditions,

the presence of blood plasma is essential. The plasma provides the environment necessary for the thrombin generation cascade, which can be initiated via the extrinsic pathway by tissue factor expressed on the surface of most tumor cells. Previous experiments have suggested that the vitality of tumor cells, which depends on pre-experimental incubation conditions, may influence platelet aggregation. The aim of this work is to investigate how the pre-experimental incubation conditions of tumor cells affect their ability to induce platelet aggregation in the presence of plasma *in vitro*.

Key words: Platelets, Tumor cells, Cell vitality, Tumor cell-induced platelet aggregation.

Введение

В современном мире онкологические заболевания продолжают оставаться одной из главных проблем медицины. Онкология занимает второе место среди причин смерти до 70 лет, уступая лишь сердечно-сосудистым заболеваниям [1]. В ходе развития заболевания могут возникать различные осложнения, в том числе тромботические. Рак-ассоциированный тромбоз является второй по частоте причиной смерти онкологических пациентов после смерти от самого рака [2]. Риск развития венозной тромбоземболии у раковых больных повышается в 4-7 раз по сравнению со здоровыми [3].

Агрегация тромбоцитов в присутствии опухолевых клеток

Известно, что опухолевые клетки способны взаимодействовать с тромбоцитами, как в месте первичного очага, так и в кровотоке [4]. Тромбоциты могут способствовать гематогенному метастазированию, образуя в кровотоке гетероагрегаты с опухолевыми клетками, в составе

которых клетки способны избежать иммунного ответа организма и агрессивного воздействия потока, перемещаясь к месту экстравазации [5].

Одним из предложенных механизмов агрегации тромбоцитов, индуцированной опухолевыми клетками, является попадание тромбоцитов в фибриновую сеть, образующуюся вокруг клетки в кровотоке вследствие запуска каскада плазменного свертывания тканевым фактором, экспонированным на поверхности опухолевых клеток [6].

Опухолевые клетки способны напрямую активировать плазменный каскад свертывания крови. Клетки злокачественной опухоли имеют на своей поверхности повышенную концентрацию тканевого фактора (ТФ) – трансмембранного гликопротеина, экспрессируемого в норме клетками практически всех тканей организма (за исключением эндотелия и клеток крови) [7] – и могут высвобождать ТФ-положительные макровезикулы [8]. Тканевый фактор активирует внешний путь плазменного каскада свертывания [9], результатом которого является генерация тромбина [10] и дальнейшее образование фибринового сгустка [11]. Тромбин – II фактор свертывания, обеспечивающий превращение фибриногена в фибрин [12]. Также помимо этого он является одним из сильных активаторов тромбоцитов. Для некоторых типов злокачественных опухолей характерна избыточная экспрессия тканевого фактора [13].

В своем исследовании Zaga и др. показали, что тканевый фактор, экспрессируемый на поверхности клеток рака молочной железы, вызывает генерацию тромбина, активацию и агрегацию отмытых в буфере тромбоцитов (ОТ) в присутствии минимального (1%) количества обедненной тромбоцитами плазмы крови (ОТП) [14]. На Рис.1 приведен типичный вид агрегационной кривой тромбоцитов в присутствии

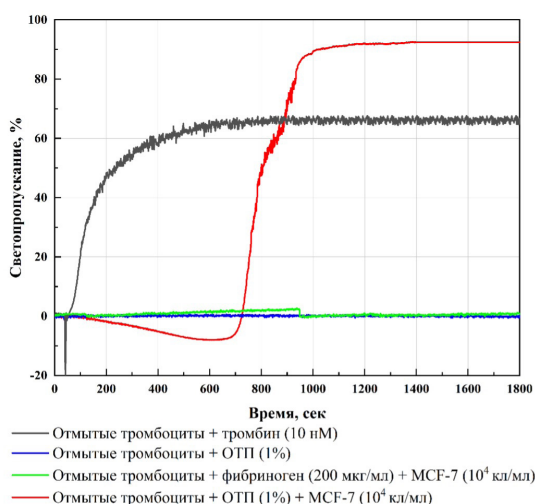


Рисунок 1. Агрегация отмытых тромбоцитов в ответ на добавление различных активаторов [6].

опухолевых клеток и 1% ОТП в сравнении с классической агрегацией, индуцированной тромбином. Отличительной особенностью подобной агрегации по сравнению с агрегацией при активации тромбином в отсутствие плазмы является наличие «двух волн» агрегации.

В ходе проведенной ранее серии агрегометрических экспериментов с опухолевыми клетками в присутствии обедненной тромбоцитами плазмы (ОТП), нами было замечено, что при продолжительной работе с клетками в течение нескольких часов наблюдается сокращение времени начала агрегации в повторяющихся постановках при одинаковой конечной концентрации клеток. В связи с этим было сделано предположение, что на агрегацию может оказывать влияние степень жизнеспособности, или витальности, клеток в момент добавления в систему, которая, вероятно, может зависеть от условий инкубации в течение продолжительной серии экспериментов.

Цель работы – исследовать влияние условий инкубации опухолевых клеток перед проведением эксперимента на агрегацию тромбоцитов в присутствии опухолевых клеток и плазмы.

Материалы и Методы

Реагенты

В ходе проведения исследования были использованы PGI₂, CaCl₂, цитрат натрия и апираза производства Sigma-Aldrich (США).

Буфер Tyrode's содержал 137 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 12 мМ NaHCO₃, 0,3 мМ NaH₂PO₄, 1 мМ MgCl₂, 5 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), 0,35% БСА (бычий сывороточный альбумин) и 5,5 мМ глюкозы-D(+) безводной в воде Milli-Q. Все реагенты, использованные в приготовлении буфера, произведены Sigma-Aldrich (США).

Для работы с клетками были использованы клеточный буфер HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Thermo Fisher Scientific (США)), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Himedia (Индия)), гентамицин (ПанЭко (Россия), A011), L-глутамин (ПанЭко (Россия), Ф033Е), фетальная бычья сыворотка (FBS, Himedia (Индия), RM10971-500ml).

Клеточная культура

Клеточная линия MCF-7 выращивалась в среде DMEM, содержащей 1% гентамицина, 1% L-глутамина и 10% фетальной бычьей сыворотки. Клетки выращивались в стерильном инкубаторе при температуре +37°C и 5%-м содержании CO₂. Конечная концентрация опухолевых клеток в постановке – 10⁴ кл/мл. Измерение концентрации клеток в суспензии проводилось на проточном

цитометре CytoFLEX.

Выбранная конечная концентрация опухолевых клеток значительно превышает наблюдаемую *in vivo* при гематогенном метастазировании, однако она является наиболее часто используемой в экспериментах, связанных с изучением явления взаимодействия опухолевых клеток и тромбоцитов *in vitro* [14], [15].

Отмытые тромбоциты

Забор цельной венозной крови производился в день эксперимента у здоровых доноров в вакуумные пробирки с цитратом натрия 3,8% (соотношение кровь: цитрат составляло 9:1).

Тромбоциты для данной работы отмывались по следующему протоколу:

Перед центрифугированием к цельной крови добавлялись PGI₂ (1 мкМ) и апираза (0,1 ед/мл). Затем кровь центрифугировалась в течение 10 минут при 150g и температуре 22 °С для получения богатой тромбоцитами плазмы (БТП). После отбора БТП инкубировалась в течение 5 минут при 37°С. Перед следующим центрифугированием к БТП добавлялся цитрат натрия (109 мМ) в пропорции 1:3 (конечная концентрация 27,25 мМ). БТП центрифугировалась в течение 10 минут при 400g и температуре 22 °С. После отбора супернатанта осадок тромбоцитов ресуспендировался в буфере Tyrode's без кальция, инкубация в течение 5 минут при 37 °С. Далее производилось измерение концентрации тромбоцитов в суспензии на проточном цитометре. После этого к суспензии тромбоцитов снова добавлялся цитрат натрия (109 мМ) в пропорции 1:3 (конечная концентрация 27,25 мМ) перед центрифугированием. Суспензия тромбоцитов центрифугировалась в течение 10 минут при 400g и температуре 22 °С. После отбора супернатанта осадок тромбоцитов ресуспендировался в буфере Tyrode's с кальцием (2 мМ CaCl₂) до фиксированной концентрации тромбоцитов 300 тыс/мкл.

Получение обедненной тромбоцитами плазмы

Для получения обедненной тромбоцитами плазмы (ОТП) цельная венозная кровь центрифугировалась при 1600g в течение 15 минут. Отобранная БТП повторно центрифугировалась при 10000g в течение 5 минут до получения ОТП.

Агрегометрия

Регистрация агрегации тромбоцитов осуществлялась по турбидиметрическому методу Борна на анализаторе агрегации Solar AP 2110. В ходе постановки суспензия отмытых тромбоцитов объемом 300 мкл непрерывно перемешивалась со скоростью 800 об/мин при температуре +37°С. В качестве калибровочного

референса использовался буфер Tyrode's. Частота регистрации данных составляла 1 с-1. Для одной серии экспериментов использовались тромбоциты и плазма одного донора.

Запись всех постановок производилась непрерывно 30 минут или до достижения максимального светопропускания с выходом на «плато».

Для каждой постановки анализировались максимальная агрегация и время достижения 1/2 максимума агрегации, рассчитанное с помощью аппроксимации данных агрегометрии логистической кривой.

Для обработки данных использовались статистический пакет IBM SPSS Statistics 23 (IBM, США), программы Prism 9 Graphpad (Graphpad Software, США), OriginPro 2021 Learning Edition (OriginLab Corporation, США) и Microsoft Excel (Microsoft, США). Для оценки значимости различий между тремя и более независимыми выборками проводился анализ с помощью критерия Манна-Уитни. Критический уровень значимости принимался равным 5%.

Результаты и обсуждение

Ухудшение состояния опухолевых клеток после снятия с клеточной поверхности сокращает время агрегации.

Суспензия опухолевых клеток разделялась между двумя пробирками в один экспериментальный день: в первой клетки сразу ресуспендировались в клеточном буфере HBSS, во второй оставались в питательной среде, в которой они были ресуспендированы после снятия с матраса.

Клетки из пробирки с буфером HBSS в течении 10-15 минут после снятия добавлялись к суспензии отмытых тромбоцитов в присутствии кальция и 1% плазмы. Данная постановка принималась контрольной для последующих. Далее пробирка помещалась в термостат с температурой 37 °С и с интервалами 30 мин, 1 час, 2 часа и 3 часа от старта контрольной постановки клетки добавлялись в повторные постановки (Рис.2А).

Клетки в пробирке с питательной средой после контрольной постановки помещались в термостат с температурой 37 °С и с интервалами 30 мин, 1 час, 2 часа и 3 часа от старта контрольной постановки часть клеточной суспензии центрифугировалась, ресуспендировалась в буфере Tyrode's и добавлялась в аналогичные постановки (Рис.2Б).

По результатам постановок с клетками в HBSS наблюдались статистически значимые изменения во времени агрегации по прошествии 3 часов в сравнении с контрольной постановкой (Рис.3В). Так пребывание опухолевых клеток в HBSS в течение 3 часов сократило время

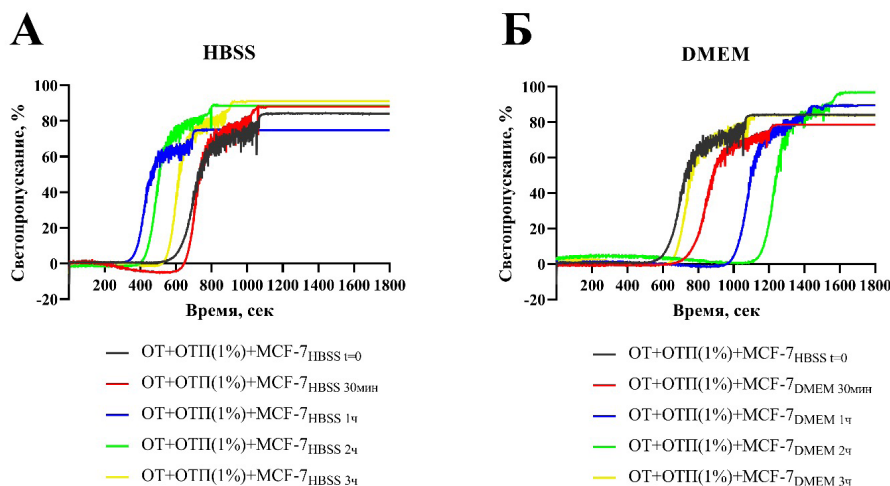


Рисунок 2. Типичные кривые агрегации суспензии отмытых тромбоцитами плазмы (ОТП) при добавлении опухолевых клетках линии MCF-7, инкубированных в HBSS (А) или в питательной среде DMEM (Б).

достижения 1/2 максимума агрегации в среднем на ~200 секунд. Также по прошествии 3 часов наблюдалось значимое увеличение средней мгновенной скорости агрегации в первые 10 минут постановки (Рис. 4А). На основании этого было сделано предположение, что при попадании в буфер вместо питательной среды клетки испытывают сильный стресс, индуцирующий апоптотические процессы в клетке, которые в свою очередь вызывают повышение экспрессии фосфатидилсерина и тканевого фактора на поверхности. Ранее в исследованиях было показано, что во взаимодействии между опухолевыми клетками и тромбоцитами ключевую роль играет плазменное свертывание крови: тромбоциты образуют с опухолевыми клетками гетеро-агрегат, активируясь от связывания тромбина и запутываясь в фибриновой сети, образующейся вокруг клетки в потоке, и тем самым защищают их от агрессивного воздействия кровотока [6]. Известно, что апоптотические опухолевые клетки демонстрируют повышенную экспрессию фосфатидилсерина и тканевого фактора [16]. Тканевой фактор, расположенный на поверхности опухолевых клеток, способен индуцировать внешний путь плазменного свертывания, результатом которого является запуск генерации тромбина и дальнейшее образование фибринового сгустка. Фосфатидилсерин на поверхности играют важную роль в плазменном каскаде свертывания, так как именно на них происходит сборка ключевых для процесса белковых комплексов [17]. Повышенная экспрессия ФС способна многократно усилить прокоагулянтный потенциал системы. Предположительно, именно повышение экспрессии фосфатидилсерина и тканевого фактора на клеточной поверхности при долгом пребывании клеток в буфере HBSS может являться причиной сокращения времени

начала агрегации и увеличения средней скорости агрегации в исследуемой постановке. Данная гипотеза требует дальнейшего исследования с применением дополнительных методов в будущем.

Для клеток, инкубированных в среде, наблюдались статистически значимые изменения во времени агрегации по прошествии 1 часа в сравнении с контрольной постановкой. При добавлении клеток через 1 час после пребывания в среде наблюдалось увеличение времени достижения 1/2 максимума агрегации в среднем на ~200 секунд. С увеличением времени инкубации клеток в среде время активации увеличивается и достигает своего пика через 1 час после начала эксперимента, затем идет на спад и по прошествии 3 часов уравнивается с значением контрольной постановки (Рис.3Г). А также в отличие от инкубации в HBSS средняя мгновенная скорость в первые 10 минут агрегации оставалась в среднем постоянной и не изменялась значимо на протяжении 3 часов (Рис.4В). Согласно выдвинутой ранее гипотезе, возможно, нахождение в питательной среде вместо буфера HBSS после снятия поддерживает исходную витальность клеток на некоторое время, после чего клетки также начинают умирать, экспрессируя тканевой фактор и фосфатидилсерин.

Значимых изменений в максимальном светопропускании (Рис. 3А, Б) и в максимальной мгновенной скорости в первые 10 мин постановки (Рис. 4Б, Г) в обоих случаях не наблюдалось.

Заключение

Таким образом, эксперименты с инкубацией клеток в буфере и в питательной среде показали, что ухудшение состояния клеток после снятия с клеточной поверхности увеличивает среднюю мгновенную скорость агрегации и сокращает время начала агрегации тромбоцитов в присутствии плазмы и опухолевых клеток. Так

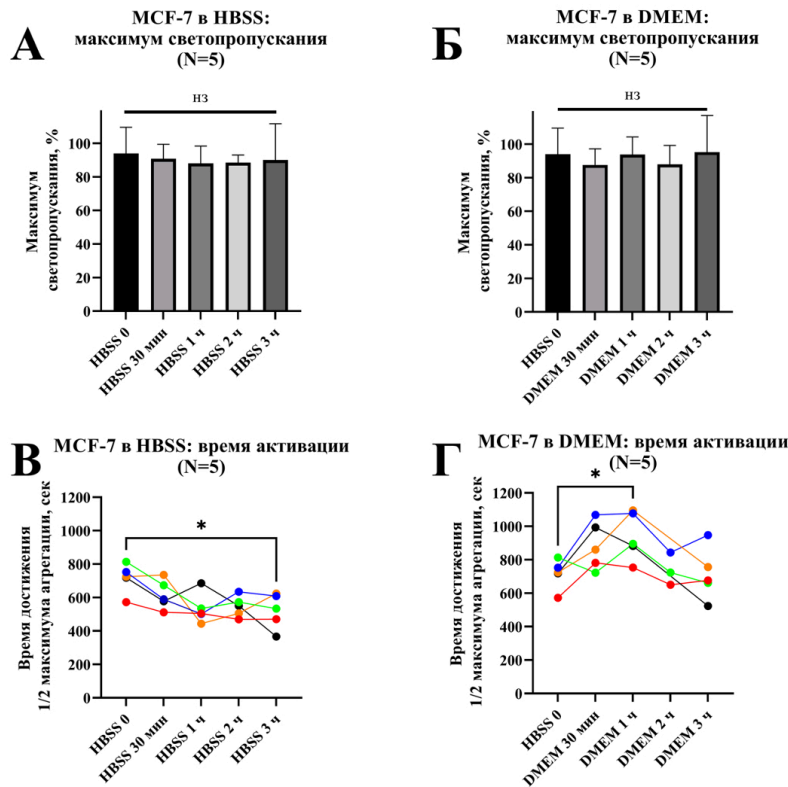


Рисунок 3. Агрегация суспензии отмывтых тромбоцитов (ОТ) в присутствии кальция и 1% обедненной тромбоцитами плазмы (ОТП) при добавлении опухолевых клеток линии MCF-7, инкубированных в HBSS или в питательной среде DMEM (n=5). А, Б – максимальное светопропускание, В, Г – время достижения 1/2 максимума агрегации. * – $p < 0.05$

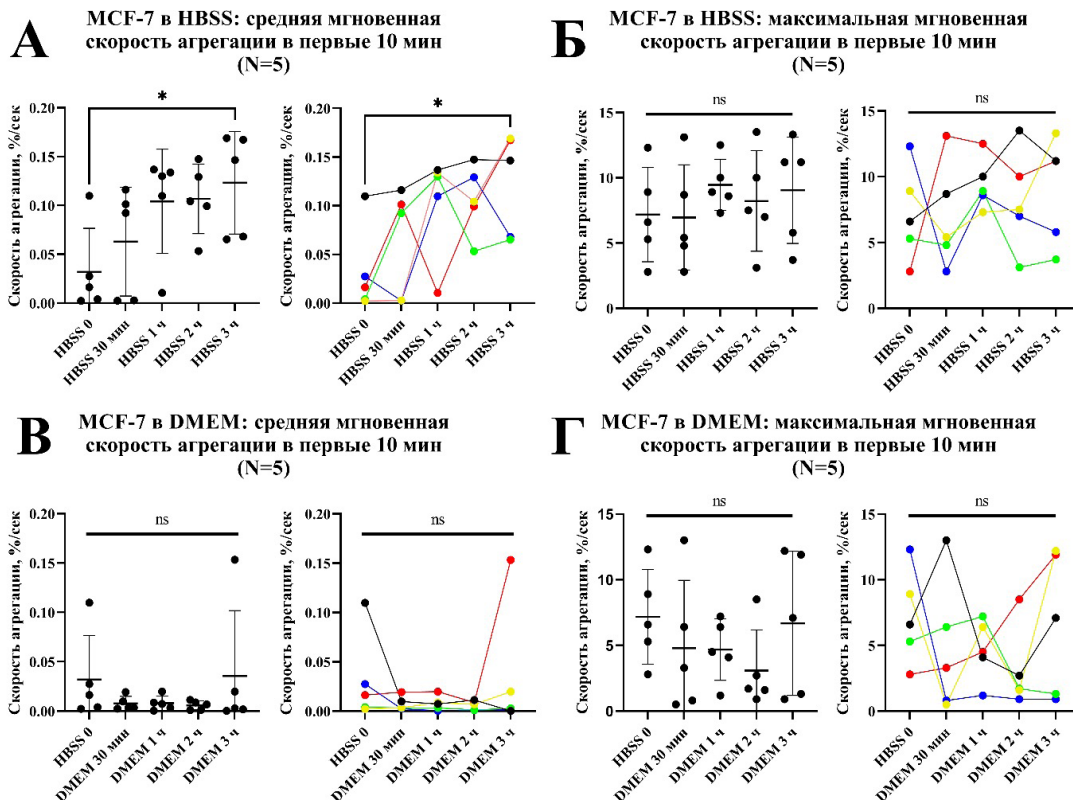


Рисунок 4. Агрегация суспензии отмывтых тромбоцитов (ОТ) в присутствии кальция и 1% обедненной тромбоцитами плазмы (ОТП) при добавлении опухолевых клеток линии MCF-7, инкубированных в HBSS или в питательной среде DMEM (n=5). А, В – средняя мгновенная скорость агрегации в первые 10 мин постановки, Б, Г – максимальная мгновенная скорость агрегации в первые 10 мин постановки. * – $p < 0.05$

пребывание опухолевых клеток в буфере вместо клеточной среды в течение 3 часов сокращает время достижения 1/2 максимума агрегации в среднем на ~200 секунд. Зависимость экспрессии

тканевого фактора и фосфатидилсерина от условий инкубации клеток требует дополнительных исследований. Однако уже сейчас можно отметить, что пребывание клеток

в питательной среде по сравнению с буфером позволяет дольше поддерживать оптимальную степень витальности для воспроизводимости показателей агрегации в рамках одной серии экспериментов, что увеличивает возможное временное окно работы с опухолевыми клетками и делает это предпочтительным методом хранения клеток перед добавлением в постановку.

Финансирование

Исследование поддержано грантом РФФ 23-45-10039.

Этические аспекты

Исследование с образцами крови человека было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией этических принципов и надлежащей клинической практики и одобрено этическим комитетом ЦТФ ФХФ РАН (код протокола 2 от 06.04.2021).

Список литературы

1. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, и A. Jemal, «Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries», *CA. Cancer J. Clin.*, т. 68, вып. 6, сс. 394–424, ноя. 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
2. A. S. Kim, A. A. Khorana, и K. R. McCrae, «Mechanisms and biomarkers of cancer-associated thrombosis», 1 ноябрь 2020 г., Mosby Inc. doi: 10.1016/j.trsl.2020.06.012.
3. S. Ikushima, R. Ono, K. Fukuda, M. Sakayori, N. Awano, и K. Kondo, «Trousseau's syndrome: Cancer-associated thrombosis», 1 март 2016 г., Oxford University Press. doi: 10.1093/jjco/hyv165.
4. S. S. McAllister и R. A. Weinberg, «The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis», *Nat. Cell Biol.*, т. 16, вып. 8, сс. 717–727, 2014, doi: 10.1038/ncb3015.
5. M. Labelle и R. O. Hynes, «The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination», *Cancer Discov.*, т. 2, вып. 12, сс. 1091–1099, дек. 2012, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0329.
6. I. Tesakov и др., «Fibrin as the mediator of tumor cell interaction with platelets», *J. Mol. Med.*, т. 103, вып. 10, сс. 1179–1190, окт. 2025, doi: 10.1007/s00109-025-02580-7.
7. M. A. Panteleev, A. N. Balandina, E. N. Lipets, M. V. Ovanesov, и F. I. Ataulakhanov, «Task-Oriented modular decomposition of biological networks: Trigger mechanism in blood coagulation», *Biophys. J.*, т. 98, вып. 9, сс. 1751–1761, 2010, doi: 10.1016/j.bpj.2010.01.027.
8. F. Ender и др., «Tissue factor activity on microvesicles from cancer patients», *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, т. 146, вып. 2, сс. 467–475,

фев. 2020, doi: 10.1007/s00432-019-03073-0.

9. N. A. Podoplelova и др., «Blood coagulation in the 21st century: Existing knowledge, current strategies for treatment and perspective», *Pediatr. Hematol. Immunopathol.*, т. 19, вып. 1, сс. 139–157, 2020, doi: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-139-157.
10. N. MacKman и M. Taubman, «Tissue factor: Past, present, and future», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, т. 29, вып. 12, сс. 1986–1988, 2009, doi: 10.1161/ATVBAHA.109.198929.
11. J. W. Weisel и C. Nagaswami, «Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled», *Biophys. J.*, т. 63, вып. 1, сс. 111–128, 1992, doi: 10.1016/S0006-3495(92)81594-1.
12. D. Y. Nechipurenko, A. M. Shibeko, A. N. Sveshnikova, и M. A. Panteleev, «In Silico Hemostasis Modeling and Prediction», 1 ноябрь 2020 г., Georg Thieme Verlag. doi: 10.1055/a-1213-2117.
13. W. Ruf, N. Yokota, и F. Schaffner, «Tissue factor in cancer progression and angiogenesis», *Thromb. Res.*, т. 125, сс. S36–S38, 2010, doi: 10.1016/S0049-3848(10)70010-4.
14. M. Zarà, I. Canobbio, C. Visconte, J. Canino, M. Torti, и G. F. Guidetti, «Molecular mechanisms of platelet activation and aggregation induced by breast cancer cells», *Cell. Signal.*, т. 48, вып. February, сс. 45–53, 2018, doi: 10.1016/j.cellsig.2018.04.008.
15. E. Heinmöller и др., «Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer cell lines», Springer-Verlag, 1996.
16. C. E. Hagan и др., «Apoptotic cells promote circulating tumor cell survival and metastasis», *Commun. Biol.*, т. 8, с. 1121, июл. 2025, doi: 10.1038/s42003-025-08541-7.
17. S. A. Smith, R. J. Travers, и J. H. Morrissey, «How it all starts: Initiation of the clotting cascade», *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, т. 50, вып. 4, сс. 326–336, 2015, doi: 10.3109/10409238.2015.1050550.

Флуориметрические методы анализа взаимодействий между молекулами

Fluorimetric methods for molecular interaction analysis

И.А. Лифшиц^{1,2,#}

I. A. Lifshits^{1,2,#}

1. ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Трубецкая, д. 8, Москва, Россия, 119048

2. МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, д. 1, Москва, Россия, 119234

Автор для переписки: IliaGrimm@yandex.ru

1. I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Trubetskaya str. 8, Moscow, Russia, 119048

2. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1-2, Moscow, Russia, 119991

Получено: 11.10.2025

Принято к публикации: 28.11.2025

Опубликовано: 30.12.2025

EDN: AGFDBM

DOI: 10.65189/2949-0758-2025-4-2-18-24

Аннотация

Анализ параметров флуоресценции является давно известным и широко используемым подходом для описания молекулярных взаимодействий, поэтому знание сильных и слабых сторон различных флуориметрических методов значительно упростит поиск подходящего способа решения конкретной задачи. В данной работе описаны флуориметрические методы, основанные на измерениях интенсивности флуоресценции, анизотропии флуоресценции и эффективности Ферстеровского резонансного переноса энергии, а также экспериментально проиллюстрированы основные подходы к детекции молекулярных взаимодействий с их помощью.

Ключевые слова: Флуоресценция; Анизотропия флуоресценции; FRET; Интенсивность флуоресценции.

Annotation

The analysis of fluorescence parameters is a well-known and widely used approach for identification of molecular interactions, therefore the knowledge of strengths and weaknesses of different fluorometric methods will greatly help with solution of specific problems. In this paper, fluorometric methods based on detection of fluorescence intensity, fluorescence anisotropy and efficiency of Forster resonance energy transfer (FRET) are described and experimentally illustrated.

Key words: Fluorescence; Fluorescence anisotropy; FRET; Fluorescence intensity.

Введение

Флуоресценция — это длящийся короткое

время процесс эмиссии света объектом после его возбуждения. Вещества, поглощающие и испускающие свет, называются флуорофорами. Флуорофорами могут являться различные классы соединений, начиная с белков, примером которых может служить широко известный GFP [1], заканчивая синтетическими молекулами, такими как флуоресцеин изотиоцианат (FITC) [2].

Флуоресценция и, вместе с ней, флуорофоры уже долгое время являются незаменимыми инструментами, используемыми для наблюдения за большинством клеточных и молекулярных процессов. Примером использования флуоресценции *in vitro* может служить флуоресцентная микроскопия, в основе которой лежит мечение предмета наблюдения флуоресцентной меткой и дальнейшая его визуализация. При облучении источником возбуждения (лазером, светодиодом и т.д.) флуорофор поглощает свет определенной длины волны и испускает свет другой, более длинной волны. Таким образом, ранее невидимые структуры становятся видимыми, что позволяет наблюдать их распределение и динамику [3].

Флуоресценцию можно использовать не только как метод визуализации, но и как метод анализа молекулярных взаимодействий. Во втором случае особенное внимание стоит уделить низкомолекулярным флуорофорам, которые могут быть использованы не только как инертные метки для макромолекул, но и как непосредственно участники реакций [4]. Вследствие этого развитие новых и уже существующих флуориметрических методов, способных определять, какие конформационные изменения произошли с флуорофором и его микроокружением, является актуальным направлением для решения ряда научных проблем. Подобные исследования могут

помочь в нахождении новых сайтов связывания на макромолекулах, новых лигандов к ним и в характеристике взаимодействий молекул.

В этой работе будут рассмотрены такие подходы как:

1) наблюдение изменения интенсивности флуоресценции при изменении микроокружения флуорофора,

2) флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET) и

3) метод анизотропии флуоресценции как распространенные подходы к анализу молекулярных взаимодействий.

Материалы и Методы

Анизотропия флуоресценции

В качестве буфера был использован BRB-80-TWEEN (80 мМ K-PIPES, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 0.005% Tween-20, pH 6.8). В нём были разведены анализируемые пробы до концентраций: глицерин - 10%, 20% и 30%; стрептавидин - 0.1 мкМ. Далее к пробам был добавлен FITC до конечной концентрации 1 мкМ. Контроль представлял собой FITC, разведённый в чистом буфере до концентрации 1 мкМ.

Пробы по 20 мкл были добавлены в 384-луночный непрозрачный планшет.

Съёмка анизотропии флуоресценции проходила в планшетном мультимодальном ридере CLARIOstar Plus (BMG Labtech). Возбуждающий свет был настроен на 482-16 нм, а эмиссионный был детектирован на 530-40 нм, для соответствия спектральным характеристикам FITC. Во время съёмки в приборе поддерживалась постоянная температура – 25 °С.

Интенсивность флуоресценции

В качестве растворителя была использована MilliQ H₂O. В ней были разведены отдельно плазмиды и краситель SYBR Green. Далее к одному разведению SYBR Green были добавлены разведённые плазмиды (SYBR Green+DNA-ds), а к другому MilliQ H₂O (Free SYBR Green).

Пробы по 20 мкл были добавлены в 384-луночный непрозрачный планшет.

Съёмка интенсивности флуоресценции проходила в планшетном мультимодальном ридере CLARIOstar Plus (BMG Labtech). Возбуждающий свет был настроен на 484-15 нм, а эмиссионный был детектирован на 529-20 нм, для соответствия спектральным характеристикам SYBR Green. Во время съёмки в приборе поддерживалась постоянная температура – 25 °С.

Ферстеровский перенос энергии

1) Подготовка к полимеризации тубулина

В двух пробирках смешать вещества в

концентрациях:

TAMRA меченного тубулина – 19.3 мкМ

Alexa-488 меченного тубулина – 61.6 мкМ

GTP – 1000 мкМ

MgCl₂ – 1000 мкМ

Таксол (во второй пробирке Майтанзин) – 250 мкМ

2) Полимеризация

Поставить обе пробирки и буфер в инкубатор на 37 °С. Инкубировать 20 минут. В качестве буфера был использован BRB-80 (80 мМ K-PIPES, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, pH 6.8)

3) Подготовка проб

Добавить в каждую из пробирок 60 мкл тёплого буфера, перемешать.

Пробы по 20 мкл были добавлены в 384-луночный непрозрачный планшет.

Съёмка интенсивности FRET проходила в планшетном мультимодальном ридере CLARIOstar Plus (BMG Labtech). Возбуждающий свет был настроен на 482-16 нм для соответствия спектральным характеристикам Alexa-488, а эмиссионный был детектирован на 585-30 нм, для соответствия спектральным характеристикам TAMRA. Во время съёмки в приборе поддерживалась постоянная температура – 25 °С.

Методы статистического анализа

Для анализа статистической значимости различий между данными в экспериментах с интенсивностью флуоресценции, FRET и анизотропией флуоресценции был использован t-критерий Стьюдента. Обозначения статистической значимости на графиках: * - 0.05 > p-value > 0.01; ** - 0.01 > p-value > 0.001; *** - 0.001 > p-value.

Результаты и обсуждение

Детекция взаимодействий по изменению интенсивности флуоресценции флуорофора.

Измерение интенсивности флуоресценции, то есть анализ числа фотонов, испускаемых возбуждённым флуорофором, является одним из самых распространённых и развивающихся методов флуориметрии как в фундаментальных научных исследованиях, так и в поточных медицинских скринингах [5]. При изменении состояния флуорофора (его связывании с другими молекулами, изменением конформации и т. д.) интенсивность флуоресценции также может изменяться, что будет свидетельством происходящих с флуорофором процессов.

В качестве иллюстративного примера использования изменения интенсивности флуоресценции как индикатора связывания молекул в растворе можно привести наблюдение взаимодействия красителя SYBR Green и

ДНК (Рис. 1). В свободном состоянии SYBR Green является слабым флуорофором, но при связывании в малой бороздке ДНК, его интенсивность флуоресценции увеличивается в несколько порядков [6]. С помощью этого можно как детектировать наличие ДНК в растворе, так и измерять её концентрацию.

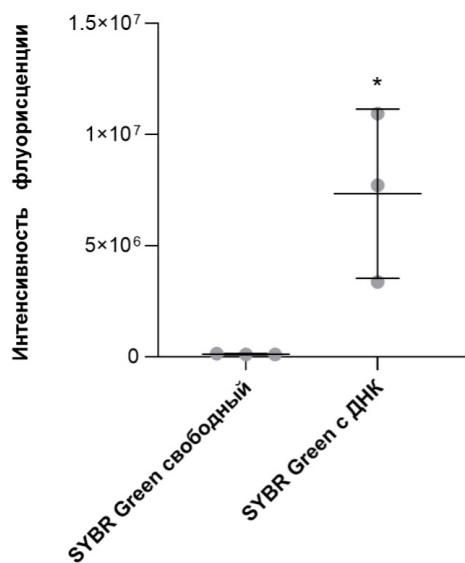


Рисунок 1. Интенсивность SYBR Green в свободном состоянии и при добавлении ДНК. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение по N=3 независимым экспериментам.

Ещё одним примером использования интенсивности флуоресценции может служить метод ПЦР (полимеразной цепной реакции) в реальном времени. При такой постановке ПЦР, помимо амплификации ДНК, второй задачей является подсчёт точного количества образующегося продукта. Сделать это можно с помощью применения специальных флуоресцирующих зондов, способных испускать свет только после взаимодействия с полимеразой (Рис. 2). По постепенному повышению интенсивности флуоресценции можно делать вывод о повышении концентрации ДНК [7].

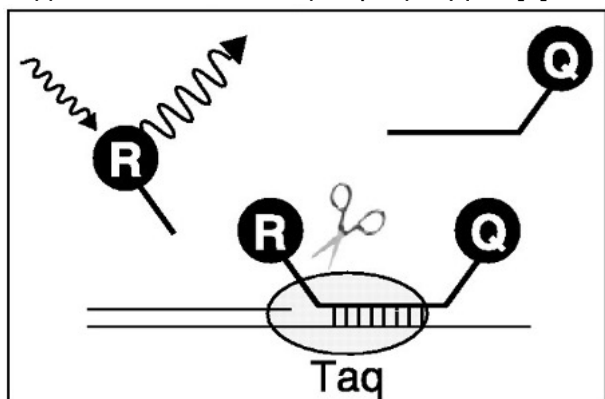


Рисунок 2. Механизм действия Taqman зонда. ДРепортерный флуорофор (R), испускает свет на длине волны, поглощаемой гасящим флуорофором (Q). Во время ПЦР-амплификации ДНК-полимераза (Taq) расщепляет зонд, высвобождая репортёр от гасителя, что позволяет измерить флуоресценцию. Иллюстрация воспроизведена из статьи [8] по лицензии Creative Commons Attribution 4.0.

Интенсивность флуоресценции может использоваться и в исследованиях лиганд-белкового взаимодействия. Такое взаимодействие характерно для известного флуоресцентного зонда белка тубулина - вещества под названием "МТС" (2-метокси-5-(2,3,4-триметоксифенил)-2,4,6-циклогептатриен-1-она), которое является структурным аналогом колхицина. МТС способен испускать свет только в связанном с тубулином состоянии, но не в свободной форме. При наличии в растворе соединения, конкурирующего с МТС за колхициновый сайт, по уменьшению интенсивности флуоресценции можно судить об успешном вытеснении МТС из комплекса с тубулином [9]. Таким образом, может осуществляться поиск и определение неохарактеризованных лигандов к активным сайтам белков с уже известным лигандом-флуорофором.

В приведённых ранее примерах интенсивность флуоресценции изменялась при взаимодействии с органическими веществами, однако увеличение концентрации неорганических солей в микроокружении белка также может привести к изменению его спектральных свойств. Примером может служить клеточный белок, связывающий ретиноевую кислоту I (CRAB I), имеющий в своей структуре остатки аминокислоты триптофана, интенсивность флуоресценции которых повышается при добавлении увеличивающихся концентраций неорганических солей (NaCl; Na₂SO₄). CRAB I изменяет свою конформацию, в результате чего, нарушается пространственная ориентация остатков аргинина и фенилаланина, блокирующих триптофан, и флуоресценция последнего перестаёт заглушаться. Увеличение интенсивности флуоресценции ввиду взаимодействия с солью было названо "усиленной солью флуоресценцией" (SEF) [10].

Несмотря на большую распространенность метода и лёгкость в его применении, измерение интенсивности флуоресценции имеет ряд недостатков, которые стоит иметь в виду [11]. Одной из главных проблем данного метода является большое количество шума, причинами которого могут быть автофлуоресценция, фоновая засветка и т.д. Также интенсивность флуоресценции очень зависима от концентрации вещества, что делает метод незащищенным от неточностей, связанных с погрешностью пипетирования и смешивания растворов.

Ферстеровский перенос энергии

Ферстеровский перенос энергии (FRET, от англ. Förster resonance energy transfer) - это процесс, происходящий между двумя молекулами - флуорофорами (донором и акцептором), в котором после возбуждения донора энергия передается молекуле-акцептору [12].

Особенностью FRET является то, что, в отличие от обычной флуоресценции, перенос энергии возможен только при соблюдении нескольких условий: 1) нахождение пары донор-акцептор на расстоянии менее чем 10 нанометров; 2) спектр эмиссии донорного флуорофора должен перекрываться со спектром поглощения акцептора; и 3) донорный флуорофор должен иметь достаточный квантовый выход [13].

Иллюстрацией использования FRET для детекции белок-белковых взаимодействий может служить эксперимент с полимеризацией тубулиновых микротрубочек. Димеры из двух субъединиц тубулина способны полимеризоваться в 13-ти протофиламентные микротрубочки. Если сополимеризовать друг с другом две фракции тубулина, одну, помеченную зеленым красителем Alexa 488, а другую – красным красителем TAMRA, то полученные микротрубочки будут состоять из связанных между собой димеров обеих фракций. Тогда можно предположить, что меченные красителями димеры будут находиться в достаточной близости друг от друга для того, чтобы между красителями Alexa 488 и TAMRA произошёл FRET (Рис. 3 А). В этой паре флуорофоров Alexa 488 будет выступать в качестве донора энергии, а TAMRA – акцептора. Следуя той же логике, если помешать полимеризации тубулина в микротрубочки, то меченые красителями димеры тубулина будут находиться в свободном состоянии в растворе и расстояние между димерами будет недостаточным для создания условий для FRET.

Подтвердить это можно экспериментально с помощью добавления в процесс полимеризации ингибиторов динамической нестабильности микротрубочек – таксола и майтанзина. Таксол – стабилизирующий агент микротрубочек, не дающий им деполимеризоваться, в то время как майтанзин – дестабилизирующий агент, при добавлении которого в раствор тубулина полимеризация в микротрубочки происходит не будет, и большая часть тубулина будет находиться в свободной форме (Рис. 3 А). При проведении детекции интенсивности FRET двух растворов (с таксолом и с майтанзином) было обнаружено статистически значимое увеличение интенсивности флуоресценции раствора с собранными микротрубочками (Рис. 3 Б), что говорит о возможности использования FRET как метода для обнаружения процессов полимеризации тубулина.

В предыдущем примере наличие FRET детектировалось по увеличению интенсивности флуоресценции акцепторного флуорофора, однако существуют и другие методы, позволяющие детектировать FRET как *in vivo*, так и *in vitro* [14]. Примером может являться использование FRET

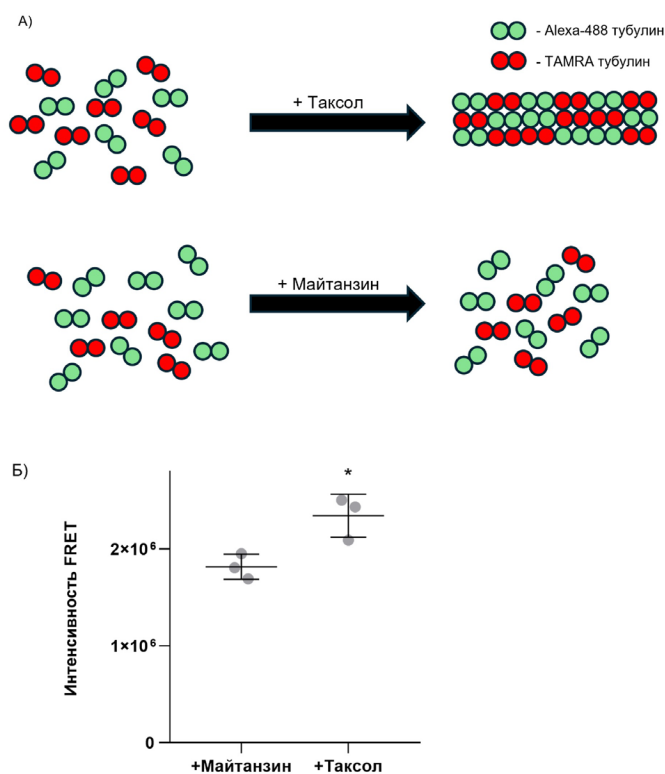


Рисунок 3. FRET между димерами тубулина, меченными красителями Alexa-488 и TAMRA при полимеризации микротрубочек. А) Постановка эксперимента по полимеризации микротрубочек в присутствии таксола и майтанзина. При добавлении таксола полимеризация тубулиновых микротрубочек происходит нормально, а при добавлении майтанзина полимеризации не происходит. Б) Интенсивность FRET в двух условиях. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение по N=3 независимым экспериментам.

с временным разрешением (TR-FRET). TR-FRET объединяет в себе FRET и флуоресценцию с временным разрешением (TRF). Главной идеей метода является использование временной задержки в микросекундном диапазоне между возбуждением флуорофорной пары и детектированием флуоресценции. Это устраняет кратковременный фоновый шум, создаваемый рассеянным возбуждающим светом и автофлуоресценцией. Однако для применения метода обычно требуются высокоспецифичные неорганические флуорофоры (например, лантаноиды), которые характеризуются большой длительностью излучения до миллисекунд [15].

Расстояние между донорным и акцепторным флуорофором играет важную роль во FRET. Зависимость эффективности переноса энергии (E) от расстояния между молекулами флуорофоров определяется нижеприведённым уравнением, где “R” указывает на фактическое расстояние между донором и акцептором, тогда как “R₀” представляет собой Ферстеровское расстояние, при котором вероятность передачи энергии составляет 50% [13].

$$E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6}$$

Таким образом, за счёт высокой обратной зависимости от расстояния между донором и акцептором, по эффективности FRET в растворе может говорить не только о наличии (или отсутствии) флуоресценции и о концентрации флуорофоров, вовлечённых в реакцию, но и о дистанции между ними.

Использование FRET в качестве “молекулярной линейки” уже нашло своё применение в исследованиях строения белков. С помощью метода микроскопии с минимальными потоками флуоресцентных фотонов (MINFLUX) удалось измерить расстояние между флуорофорами с точностью до ангстрем. Таким образом, при присоединении FRET пары к, например, остаткам аминокислот белка расстояние между ними можно визуализировать с помощью световой микроскопии [16].

С помощью FRET можно также и детектировать изменения в структуре нуклеиновых кислот. Примером может служить синтезированная Пре-МикроРНК, где оба флуорофора находятся в разных частях одного олигонуклеотида. Таким образом, в зависимости от того, насколько изменилась интенсивность FRET, можно судить о пространственном сближении (или разделении) донора и акцептора, сообщаящем об изменении конформации олигонуклеотида [17].

К недостаткам FRET можно отнести усложнённый поиск флуорофоров, так как спектры излучения донора и возбуждения акцептора должны перекрываться для соблюдения условий FRET. Также при использовании интенсивности донора или акцептора как метода детекции FRET могут возникнуть те же проблемы, что при прямом измерении интенсивности флуоресценции (автофлуоресценция, автогашение и т.д.) [18].

Анизотропия флуоресценции

В отличие от методов на основе измерения интенсивности флуоресценции и FRET, анализ анизотропии флуоресценции использует другую характеристику света - его поляризацию. Для любого раствора флуорофоров поляризованный свет будет возбуждать только те молекулы в растворе, которые находятся в определённой ориентации; то же самое верно и для эмиссии света: ориентация молекулы определяет поляризованность испускаемого света [19]. Если измерительный прибор способен измерять интенсивность света при двух ортогональных поляризациях, то можно определить степень поляризации флуоресценции как соотношение между этими сигналами. Эта величина зависит от вращения молекулы флуорофора за время между возбуждением и эмиссией света, соответственно, чем больше коэффициент вращательной диффузии, тем в среднем быстрее она будет

поворачиваться в растворе в результате тепловых колебаний, и, следовательно ее ориентация в момент испускания света останется ближе к той, в которой произошло возбуждение. Этот эффект описывается ниже представленным уравнением Перрена, где r - наблюдаемая анизотропия; r_0 – внутренняя анизотропия молекулы; τ – время жизни флуоресценции и φ – характерное время вращения [20].

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\varphi}}$$

Иначе говоря, скорость случайного вращения, а значит, и измеряемая степень поляризации или анизотропия флуоресценции, напрямую зависит от физических характеристик молекулы флуорофора (размера, формы) и характеристик его окружения (вязкость, гидрофобность среды) [21].

Проиллюстрировать формулу Перрена можно с помощью наглядного эксперимента, в котором, увеличивая вязкость раствора, добавляя в него повышающую концентрацию глицерина, мы замедляем случайное вращение молекул флуорофора FITC, тем самым увеличиваем возможность успеть испустить флуоресценцию в направлении возбуждения (Рис. 4 А). Согласно ожиданиям, анизотропия повышается с увеличением вязкости раствора.

Таким образом, анизотропию флуоресценции можно использовать в качестве метода определения физических характеристик растворов. Такие характеристики, как вязкость и температура, влияют на анизотропию флуоресценции низкомолекулярных флуорофоров, что позволяет использовать ее для вискозо- и температурометрии [22].

В то же самое время, с помощью анизотропии флуоресценции можно характеризовать взаимодействия типа “лиганд-белок”, где в роли лиганда выступает низкомолекулярный флуорофор. В такой постановке, в свободном виде флуорофор будет испускать низко поляризованный свет, а образованный во время реакции комплекс с белком - высоко поляризованный. Наглядным примером может служить взаимодействие биотина, меченного FITC, и белка стрептавидина - часто используемого в молекулярной биологии за счёт своей высокой аффинности к биотину [23] (Рис. 4 Б). Как видно из графика – комплексы стрептавидин-биотин-FITC обладают намного более высокой анизотропией, чем флуорофор в свободном виде.

О взаимодействии белка-мишени с его низкомолекулярными лигандами можно судить по конкуренции за один и тот же сайт связывания между немеченым и флуоресцентно меченым лигандом, называемым флуоресцентным зондом. При связывании с белком-мишенью анизотропия

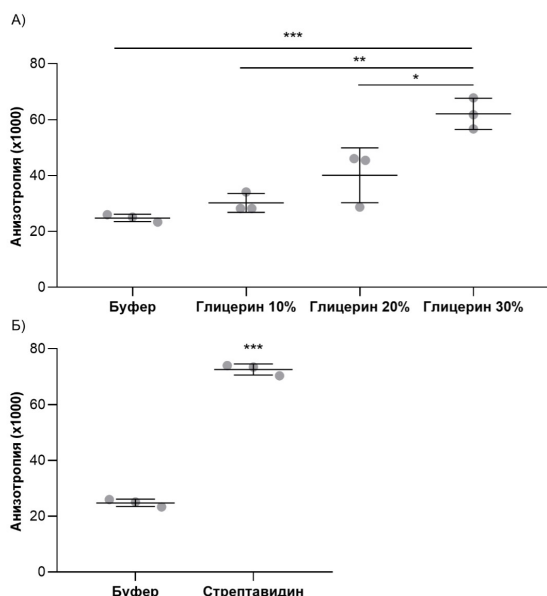


Рисунок 4. Изменение анизотропии флуоресценции.

Постановка эксперимента по полимеризации микротрубочкеА) Увеличение анизотропии FITC с увеличением вязкости раствора. Б) Увеличение анизотропии комплекса стрептавидин-биотин-FITC. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение по N=3 независимым экспериментам.

флуоресценции зонда будет повышаться, а при конкурентном вытеснении зонда из того же сайта немеченым лигандом – понижаться. Эту стратегию можно применять для выявления высокоаффинных лигандов определённого белкового сайта [24].

Также большой популярностью такой подход пользуется в экспериментах, где в роли лиганда выступает меченый олигонуклеотид и проверяется его способность связываться с ядерными белками, такими как полимеразы [25].

Помимо использования анизотропии флуоресценции как метода детекции связывания микро- и макромолекул между собой, он может применяться и как характеристика изменений, происходящих со структурой молекулы. Примером является детекция денатурации белка, где в собранном состоянии объём белка значительно меньше, чем в денатурированном варианте, и, соответственно, во время разборки детектируемая анизотропия будет увеличиваться [26].

Так как метод анизотропии флуоресценции полагается не на абсолютное значение интенсивности флуоресценции флуорофоров, а на соотношение интенсивностей в перпендикулярных направлениях поляризации света, то концентрационные погрешности не будут оказывать влияния на выходные значения. Однако большая зависимость метода от размеров молекул часто ограничивает его применимость использованием низкомолекулярных флуорофоров для получения

четкого сигнала. Для преодоления этой проблемы уже разрабатываются подходы по увеличению динамического диапазона измерений с целью приспособить метод и к молекулам большего размера [27].

Заключение

Использование флуоресценции для получения более точной оценки происходящих в растворе процессах уже давно является эффективным инструментом в исследованиях *in vivo*, *in vitro* и даже *in situ*. Флуориметрические методы, открытые ещё в 20-ом веке, не только не потеряли своей актуальности, но и находят своё применение во всё больших областях науки. Благодаря постоянному совершенствованию оптических технологий и нахождению новых целей для применения флуориметрии, с помощью интенсивности флуоресценции, FRET и анизотропии стало возможно не только говорить о наличии взаимодействия между молекулами как такового, но и давать более точную характеристику этого процесса.

Финансирование

Исследование не получало внешнего финансирования.

Благодарности

Экспериментальная часть работы проведена с использованием оборудования мультимодальный ридер CLARIOstar Plus, приобретённого в рамках федерального проекта «Развитие инфраструктуры для научных исследований и подготовки кадров» по программе «Наука и университеты»; оборудование включено в ЦКП «Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование» при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Zimmer M. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chem Rev.* 1 март 2002 г.;102(3):759–82. DOI: 10.1021/cr010142r
2. Martynov V, Pakhomov A, Popova N, Deyev I, Petrenko A. Synthetic fluorophores for visualizing biomolecules in living systems. *Acta Naturae* Английская Версия. 2016 г.;8(4 (31)):33–46
3. Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods.* декабрь 2005 г.;2(12):910–9. DOI: 10.1038/nmeth817

4. Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors. *Pharmacol Ther.* 1 ноябрь 2003 г.;100(2):101–18. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2003.08.001
5. Schwartz A, Wang L, Early E, Gaigalas A, Zhang Y zhong, Marti GE, и др. Quantitating Fluorescence Intensity from Fluorophore: The Definition of MESF Assignment. *J Res Natl Inst Stand Technol.* 2002 г.;107(1):83–91. DOI: 10.6028/jres.107.009
6. Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, и др. SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. *J Fluoresc.* 2012 г.;22(4):1189–99. DOI: 10.1007/s10895-012-1059-8
7. Blacket MJ, Robin C, Good RT, Lee SF, Miller AD. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol Ecol Resour.* 2012 г.;12(3):456–63. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03104.x
8. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* сентябрь 2005 г.;29(3):151–9. DOI: 10.1152/advan.00019.2005
9. Antúnez-Mojica M, Rodríguez-Salarichs J, Redondo-Horcajo M, León A, Barasoain I, Canales Á, и др. Structural and Biochemical Characterization of the Interaction of Tubulin with Potent Natural Analogues of Podophyllotoxin. *J Nat Prod.* 26 август 2016 г.;79(8):2113–21. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00428
10. Millan S, Swain BC, Tripathy U, Mishra PP, Sahoo H. Effect of micro-environment on protein conformation studied by fluorescence-based techniques. *J Mol Liq.* 15 декабрь 2020 г.;320:114489. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.114489
11. Lahlou A, Tehrani HS, Coghil I, Shpinov Y, Mandal M, Plamont MA, и др. Fluorescence to measure light intensity. *Nat Methods.* декабрь 2023 г.;20(12):1930–8. DOI: 10.1038/s41592-023-02063-y
12. Förster Th. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys.* 1948 г.;437(1–2):55–75. DOI: 10.1002/andp.19484370105
13. Shrestha D, Jenei A, Nagy P, Vereb G, Szöllösi J. Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies. *Int J Mol Sci.* 25 март 2015 г.;16(4):6718–56. DOI: 10.3390/ijms16046718
14. Fang C, Huang Y, Zhao Y. Review of FRET biosensing and its application in biomolecular detection. *Am J Transl Res.* 15 февраль 2023 г.;15(2):694–709.
15. Liu Y, Zhou S, Tu D, Chen Z, Huang M, Zhu H, и др. Amine-functionalized lanthanide-doped zirconia nanoparticles: optical spectroscopy, time-resolved fluorescence resonance energy transfer biodetection, and targeted imaging. *J Am Chem Soc.* 12 сентябрь 2012 г.;134(36):15083–90. DOI: 10.1021/ja306066a
16. Sahl SJ, Matthias J, Inamdar K, Weber M, Khan TA, Brüser C, и др. Direct optical measurement of intramolecular distances with angstrom precision. *Science.* 11 октябрь 2024 г.;386(6718):180–7. DOI: 10.1126/science.adj7368
17. Bood M, del Nogal AW, Nilsson JR, Edfeldt F, Dahlén A, Lemurell M, и др. Interbase-FRET binding assay for pre-microRNAs. *Sci Rep.* 30 апрель 2021 г.;11(1):9396. DOI: 10.1038/s41598-021-88922-0
18. Zhang Y, Ma X, Zhu M, Wang VYF, Guo J. Progress and Prospects in FRET for the Investigation of Protein–Protein Interactions. *Biosensors.* сентябрь 2025 г.;15(9):624. DOI: 10.3390/bios15090624
19. Lakowicz JR. Fluorescence Anisotropy. B: Lakowicz JR, редактор. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Boston, MA: Springer US; 1999. с. 291–319. DOI: 10.1007/978-1-4757-3061-6_10
20. Ozinskas AJ. Principles of Fluorescence Immunoassay. B: Lakowicz JR, редактор. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Probe Design and Chemical Sensing* Boston, MA: Springer US; 1994. с. 449–96. DOI: 10.1007/0-306-47060-8_14
21. Gradinaru CC, Marushchak DO, Samim M, Krull UJ. Fluorescence anisotropy: from single molecules to live cells. *Analyst.* 22 февраль 2010 г.;135(3):452–9. DOI: 10.1039/B920242K
22. Jain P, Motosuke M. Fluorescence Anisotropy Studies on Bodipy (Pyrromethene 546) Dye as a Novel Thermal Probe. *J Fluoresc.* 1 март 2022 г.;32(2):737–43. DOI: 10.1007/s10895-021-02868-0
23. Dundas CM, Demonte D, Park S. Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1 ноябрь 2013 г.;97(21):9343–53. DOI: 10.1007/s00253-013-5232-z
24. Dutta A, Szekely Z, Guven H, Li XP, McLaughlin JE, Tumer NE. A fluorescence anisotropy-based competition assay to identify inhibitors against ricin and Shiga toxin ribosome interactions. *Anal Biochem.* сентябрь 2024 г.;692:115580. DOI: 10.1016/j.ab.2024.115580
25. LiCata VJ, Wowor AJ. Applications of fluorescence anisotropy to the study of protein-DNA interactions. *Methods Cell Biol.* 2008 г.;84:243–62. DOI: 10.1016/S0091-679X(07)84009-X
26. Chullipalliyalil K, Elkassas K, McAuliffe MAP, Vucen S, Crean A. In-Vial Detection of Protein Denaturation Using Intrinsic Fluorescence Anisotropy. *Anal Chem.* 7 февраль 2023 г.;95(5):2774–82. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c03912
27. Volpato A, Ollech D, Alvelid J, Damenti M, Müller B, York AG, и др. Extending fluorescence anisotropy to large complexes using reversibly switchable proteins. *Nat Biotechnol.* апрель 2023 г.;41(4):552–9. DOI: 10.1038/s41587-022-01489-7

Роль тромбоцитарных микроРНК при раке молочной железы

The role of platelet microRNAs in breast cancer

В.А. Усова^{1#}, И.А. Дремук².

V. A. Usova^{1#}, I.A. Dremuk².

1. Белорусский государственный университет, пр. Независимости 4, Минск, Республика Беларусь, 220030

2. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, ул. Академическая 27, Минск, Республика Беларусь, 220072

Автор для переписки: usovavaleria.a05@gmail.com

1. Belarusian State University, Nezavisimosti Avenue 4, Minsk, Belarus, 220030

2. Institute of Biophysics and cell engineering of the national Academy of Sciences of Belarus, Akademicheskaya street 27, Minsk, Belarus, 220072

Получено: 11.10.2025

Принято к публикации: 23.11.2025

Опубликовано: 30.12.2025

EDN: OXUMNT

DOI: 10.65189/2949-0758-2025-4-2-25-29

Аннотация

Тромбоцитарные микроРНК играют важную роль в развитии рака, в том числе рака молочной железы, оказывая онкогенное или опухолесупрессивное действие. В отличие от циркулирующих, тромбоцитарные микроРНК транспортируются тромбоцитами и отщепляющимися от них частицами, которые обеспечивают эффективную таргетную доставку микроРНК, которые могут стимулировать, либо подавлять рост опухоли, ангиогенез и метастазирование, оказывая влияние на опухолевое микроокружение и защиту опухоли от компонентов иммунной системы, что делает их перспективными в дальнейшем использовании в диагностике и терапии онкологических заболеваний.

Ключевые слова: Тромбоцитарные микровезикулы, МикроРНК, Рак молочной железы.

Annotation

Platelet-derived microRNAs play a key role in the development of cancer, including breast cancer, exerting both oncogenic and tumor-suppressive effects. Unlike circulating microRNAs, platelet-derived microRNAs are transported by platelets and particles released from them (microvesicles, exosomes), enabling effective targeted delivery of microRNAs that can promote or suppress tumor growth, angiogenesis, and metastasis by influencing the tumor microenvironment and tumor protection from immune system components. This makes them promising for future use in cancer diagnosis and therapy.

Key words: Platelet microvesicles, MicroRNA, Breast cancer.

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является основной причиной смертности от рака среди женщин по всему миру и занимает второе место среди наиболее часто диагностируемых онкологических заболеваний (11,6% от всех случаев рака в мире) и четвертое место среди причин смерти от рака во всем мире [1].

Современные стратегии лечения, среди которых наиболее привлекательной считается таргетная терапия, значительно улучшили показатели выживаемости, однако всё ещё предстоит решить проблемы лекарственной резистентности, негативных побочных явлений, метастазирования, рецидивов, ранней диагностики и мониторинга [2].

Изучение микроРНК открывает новые возможности для диагностики и потенциальной терапии: их используют в качестве биомаркеров и регуляторов экспрессии генов, поскольку экспериментально доказана их способность подавлять гены раковых клеток и ингибировать рост, ангиогенез и метастазирование солидных опухолей [3].

Тромбоциты являются одними из первых клеток, с которыми сталкиваются раковые клетки, отделившиеся от первичной опухоли и попавшие в кровоток. Также тромбоциты могут подвергаться влиянию циркулирующих опухолевых клеток и, активировавшись, защищать метастазирующие клетки, например, от действия иммунокомпетентных клеток. Одним из следствий активации тромбоцитов также является отпочковывание различных частиц, таких как микровезикулы, экзосомы и апоптотические тела, принимающих участие в межклеточной коммуникации и горизонтальном переносе широкого спектра молекул, в том числе, микроРНК, а такой перенос обеспечивает их

постоянство и мобильность [3].

На сегодняшний день имеется ряд исследований, в которых прослеживается взаимосвязь между изменением в экспрессии различных микроРНК между здоровыми людьми и пациентами с РМЖ. Тромбоцитарные микроРНК при РМЖ могут вести себя по-разному, что подтверждает недавнее пилотное исследование, в котором изучались тромбоцитарные микровезикулы (ТМВ), выделенные из плазмы крови пациентов с разными онкопатологиями. Было выявлено достоверное снижение экспрессии микроРНК-103 в ТМВ пациентов с раком лёгких и раком почки по сравнению с группой здоровых доноров. Ранее данная микроРНК была замечена и у пациентов с трижды негативным РМЖ и активно экспрессировалась в группе рецидивов, а также она была одной из немногих микроРНК, сохранивших свою прогностическую значимость [4, 5].

Немало исследований посвящено изучению циркулирующих микроРНК при РМЖ. Так, в одном из них большинство микроРНК при РМЖ было снижено, но микроРНК-155 и микроРНК-21 были значительно повышены. Уровни экспрессии микроРНК-27а, микроРНК-122 и микроРНК-155 в сыворотке крови были значительно повышены у пациентов с ранней стадией РМЖ по сравнению с пациентами с доброкачественными опухолями молочной железы и здоровыми людьми [6, 7]. Наш обзор посвящён изучению имеющихся на сегодняшний день исследований о роли тромбоцитарных микроРНК при РМЖ.

Участие тромбоцитов в развитии рака

Тромбоциты – это небольшие (диаметром около 2 мкм) безъядерные форменные элементы крови, имеющие в своём составе помимо органоидов различные гранулы: лизосомальные, плотные и α -гранулы [8].

Помимо общеизвестной роли тромбоцитов в гемостазе, существуют и менее известные их биологические функции: регуляция активности иммунных, гладкомышечных и эндотелиальных клеток, а также участие в развитии различных заболеваний, в том числе и онкопатологий. Тромбоциты экспрессируют на своей поверхности различные рецепторы и под действием опухолевых клеток выделяют факторы роста, формирующие благоприятное для рака микроокружение, способствующее механическому закреплению в местах метастазирования, атаки НК-клеток и аноксиса. Тромбоциты могут инициировать эпителиально-мезенхимальный переход, способствующий прогрессированию и инвазивности рака, а также они опосредуют задержку опухолевых клеток на

сосудистой стенке с помощью молекул клеточной адгезии и способствуют экстравазации опухолевых клеток за счет проангиогенных факторов роста в субэндотелиальный матрикс удаленного органа [9, 10].

Самым распространённым типом мембранных везикул, выделяющихся при активации тромбоцитов, являются ТМВ: их доля в циркуляции достигает 90 % от общего количества внеклеточных везикул в сыворотке крови [11].

ТМВ – небольшие сферические внеклеточные везикулы от 100 до 1000 нм в диаметре. Размер, физические характеристики и содержимое ТМВ непостоянны и зависят от окружающей среды/микроокружения, состояния родительского тромбоцита, типа активационного стимула и агонистов, вызывающих активацию тромбоцитов с последующим отщеплением внеклеточных везикул. ТМВ несут в себе различные молекулярные компоненты и могут преодолевать большие расстояния, прежде чем будут поглощены клетками-реципиентами. ТМВ также осуществляют посттранскрипционное перепрограммирование клеток гладких мышечных волокон, иммунной системы и эндотелия, а также способствуют пролиферации последних и, как тромбоциты, влияют на ангиогенез [3, 12-15].

Помимо тромбоцитарной активации, образование микровезикул может вызывать: связывание агонистов (тромбоксан А2 (ТХА2), аденозиндифосфат (АДФ) и тромбин), сдвиговый стресс, гипоксия, апоптоз и длительное хранение. Известно, что контакт с молекулами адгезии эндотелия также способствует тромбоцитарной активации, сопровождающейся высвобождением гранулярных медиаторов и последующей агрегацией [3].

Таким образом, тромбоциты и ТМВ вовлечены в развитие рака. Они способствуют росту опухоли, образованию новых кровеносных сосудов и метастазированию, влияя на опухолевое микроокружение и иммунную защиту опухоли, что делает их перспективными для использования в диагностики и терапии онкологических заболеваний.

Роль микроРНК при раке молочной железы

МикроРНК – это малые некодирующие РНК, состоящие из 19-24 нуклеотидов, которые регулируют широкий спектр биологических процессов, включая канцерогенез, ангиогенез, клеточные процессы дифференциации, пролиферацию, миграцию, апоптоз и другие, однако большинство микроРНК посттранскрипционно регулируют экспрессию генов путём специфического связывания с 3'-нетранслируемой областью мРНК,

способствуя её деградации или дестабилизации, с последующим ингибированием трансляции [16-18].

Некоторые микроРНК обладают значительным прогностическим потенциалом: обнаружено, что уровни экспрессии микроРНК-17-5p, микроРНК-125a, микроРНК-125b, микроРНК-200a, Let-7a, микроРНК-34a, микроРНК-21, микроРНК-99a и микроРНК-497 в сыворотке крови имеют прогностическое значение при РМЖ. Например, комбинация уровней трех микроРНК – микроРНК-17-5p, микроРНК-155 и микроРНК-222 – в сравнении с опухолевыми маркерами (РЭА (раково-эмбриональный антиген) и СА15-3) для скрининга РМЖ, показала, что комплекс микроРНК оказался эффективнее опухолевых маркеров для ранней диагностики, особенно в группах высокого риска. Особенно высокопрогностичен был уровень микроРНК-155 в сыворотке крови при определении рецидива РМЖ на ранних стадиях [7].

Показано, что микроРНК-21 регулирует эпителиально-мезенхимальный переход и последующее метастазирование при РМЖ, что делает её потенциальной мишенью для контроля стволовых форм и агрессивности раковых клеток. Другое исследование показало, что микроРНК-126-3p снижала экспрессию киназы АКТ2, тем самым ингибируя пролиферацию и инвазию как в трижды негативном, так и в менее агрессивном подтипе А люминального рака молочной железы [19, 20].

Тромбоцитарные микроРНК как потенциальные биомаркеры при раке молочной железы

Тромбоцитарные микроРНК оказываются в тромбоцитах несколькими путями. Большая часть микроРНК локализуется в тромбоцитах сразу в зрелом состоянии благодаря процессу отшнуровывания от мегакариоцитов в костном мозге. Также тромбоциты склонны к поглощению веществ из окружающей среды и передаче их другим клеткам [21].

Если говорить о функциях конкретных тромбоцитарных микроРНК, то они могут иметь либо онкогенное, либо опухолесупрессивное действие, либо же одна микроРНК может обладать обоими свойствами, но проявлять одно из них в зависимости от микроокружения (например, тип, молекулярный подтип, стадию развития опухоли, состав внутренней среды). К последним относятся некоторые тромбоцитарные микроРНК: микроРНК-27a, микроРНК-24, микроРНК-155, let-7a/b и микроРНК-223. Повышение уровня микроРНК-155 ингибирует трансляцию мРНК, таких как RhoA, FOXO3A и SOCS1, что приводит

к уклонению от апоптоза и увеличению пролиферации клеток и часто было связано с рецидивирующими опухолями после лучевой или химиотерапии, а также в большинстве первичных опухолей. Также было показано, что онкогенная микроРНК-223, полученная из ТМВ, способствует инвазии опухолевых клеток путем снижения регуляции опухолевого супрессора EPB41L3 [22-25].

Показано также, что как высокий уровень тромбоцитарной микроРНК-126, так и низкий уровень киназы АКТ2 (прямая мишень для miR-126-3p) были связаны с благоприятным долгосрочным прогнозом у пациентов с раком молочной железы [20].

Таким образом, из ограниченного числа исследований уже известно, что тромбоцитарные микроРНК при РМЖ способствуют прогрессированию опухоли, метастазированию и терапевтической резистентности, переносясь в опухолевые клетки и влияя на экспрессию генов. В то время как некоторые микроРНК способствуют развитию РМЖ, другие оказывают противоопухолевое действие, что делает их роль сложной и зависящей от конкретного типа микроРНК.

Заключение

Тромбоциты выступают в качестве носителей микроРНК, которые переносятся в клетки РМЖ через микровезикулы и экзосомы, влияя на микросреду опухоли и способствуя её росту и метастазированию.

У пациентов с РМЖ часто наблюдается аномальная экспрессия микроРНК, и, как следствие, использование тромбоцитарных микроРНК в качестве диагностических и прогностических биомаркеров находится в центре внимания текущих исследований в этой области. Немногочисленные исследования показывают, что тромбоцитарные микроРНК могут играть двоякую роль, выступая как в роли онкогена, так и в роли онкосупрессора. Например, miR-126 демонстрирует противоопухолевый эффект, включая остановку клеточного цикла и ингибирование миграции клеток. Напротив, микроРНК-223 способствует инвазии опухолевых клеток, проявляя онкогенные свойства. Дальнейшее изучение микроРНК, локализованных в тромбоцитах, открывает новые возможности для диагностики и терапии.

Вклад авторов:

Концептуализация и подготовка черновика – Усова В.А.; редактирование и руководство – Дремук И.А. Все авторы прочитали и

согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (грант №Б23РНФ-162) и Российским научным фондом (грант РФФ23-45-10039).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Bray F, et al. (2024) Global cancer statistics 2022: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clinicians*, 74:229–263. <https://doi.org/doi:10.3322/caac.21834>
2. Grimaldi AM, Salvatore M, Incoronato M (2025) Mirna-based therapeutics in breast cancer: A systematic review, *Frontiers*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.668464>
3. Mussbacher, M. et al. (2025) Horizontal microRNA transfer by platelets – evidence and implications, *Frontiers*. <https://doi.org/doi:10.3389/fphys.2021.678362>
4. Дремук И.А., и др. Влияние микроРНК тромбоцитарных микровезикул на пролиферативную активность опухолевых клеток линий А549 и ОКР-GS. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем»: Межд. Науч. Конф. 16 съезд БООФиБ, 2024. С. 191
5. Kleivi Sahlberg, K. et al. (2015) 'A serum MicroRNA signature predicts tumor relapse and survival in triple-negative breast cancer patients', *Clinical Cancer Research* 21(5):1207–1214. <https://doi.org/doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2011>
6. Iorio, M.V. et al. (2005) 'MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer', *Cancer Research* 65(16), pp. 7065–7070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1783>
7. Srujan S, Sahu S, Mishra TS, Muduly DK, Mishra P, Mohakud S (2025) Diagnostic efficacy of circulating microRNAs-27a, -122 and -155 in detecting early-stage breast cancer. *Int J Epigenetics* 5(1):1–12. <https://doi.org/10.3892/ije.2025.28>
8. Free SR, Carraway KL. Platelets in hematogenous breast cancer metastasis: Partners in crime, *Breast Cancer*, 2022. pp. 101–114. doi:10.36255/exon-publications-breast-cancer-platelets.
9. Schlesinger M, (2018) Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis, *J Hematol Oncol* 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0669-2>
10. Zhou L, Zhang Z, Tian Y, Li Z, Liu Z, Zhu S (2023) The critical role of platelet in cancer progression and metastasis. *Eur J Med Res* 28(1):385. <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01342-w>
11. Italiano JE Jr, Mairuhu AT, Flaumenhaft R (2010) Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr Opin Hematol* 17(6):578–584. <https://doi.org/10.1097/moh.0b013e32833e77ee>
12. Zaldivia MTK, McFadyen JD, Lim B, Wang X, Peter K. (2017) Platelet-derived microvesicles in cardiovascular diseases. *Front Cardiovasc Med* 4:74. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00074>
13. Lazar S, Goldfinger LE. (2021) Platelets and extracellular vesicles and their cross talk with cancer. *Blood* 137(23):3192–3200. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004119>
14. Michael JV, Wurtzel JGT, Mao GF, Rao AK, Kolpakov MA, Sabri A, et al. (2017) Platelet microparticles infiltrating solid tumors transfer miRNAs that suppress tumor growth. *Blood* 130(5):567–580. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-751099>
15. Varon D, Shai E (2009) Role of platelet-derived microparticles in angiogenesis and tumor progression. *Discov Med* 8(43):237–241.
16. Loh HY, Norman BP, Lai KS, Rahman NMANA, Alitheen NBM, Osman MA (2019) The regulatory role of microRNAs in breast cancer. *Int J Mol Sci* 20(19):4940. <https://doi.org/10.3390/ijms20194940>
17. Peng Y, Croce CM (2016) The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther* 1:15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
18. Valihrach L, Androvic P, Kubista M (2020) Circulating miRNA analysis for cancer diagnostics and therapy. *Mol Aspects Med* 72:100819. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.10.002>
19. Arisan E, et al. MiR-21 is required for the epithelial–mesenchymal transition in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1557. <https://doi.org/10.3390/ijms22041557>
20. Sibilano M, Tullio V, Adorno G, Savini I, Gasperi V, Catani MV (2022) Platelet-derived miR-126-3p directly targets AKT2 and exerts. Further insights in platelet-cancer interplay, *International journal of molecular sciences* 23(10):5484. <https://doi.org/10.3390/ijms23105484>
21. Cecchetti L, Tolley ND, Michetti N, Bury L, Weyrich AS, Gresle P (2022) Megakaryocytes differentially sort mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors into platelets: a mechanism for regulating synthetic events. *Blood* 118(7):1903–1911. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-324517>
22. Dremuk IA, Sveshnikova AN, Shamova EV (2025) The role of platelet microRNAs in cancer. *Hämostaseologie*. <https://doi.org/10.1055/a-2617-9786>
23. Matisse S, Suetani RJ, Neilsen PM, Callen DF. The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(8):1236–1243. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0173>
24. Kong W, He L, Coppola M, Guo J, Esposito NN, Coppola D, et al. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *J Biol Chem*. 2010;285(23):17869–17879. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.101055>

25. Liang H, Yan X, Pan Y, Wang Y, Wang N, Li L, et al. MicroRNA-223 delivered by platelet-derived microvesicles promotes lung cancer cell invasion via targeting tumor suppressor EPB41L3. *Mol Cancer*. 2015;14(1):58. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0327-z>

Основные подходы в конструировании микрофлюидных камер для анализа системы гемостаза

Main approaches to the design of microfluidic chambers for hemostasis system analysis

А.Д. Шумко^{1#}, А.И. Давыденко¹.

A. D. Shumko^{1#}, A.I. Davydenko¹.

1. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, ул. Академическая 27, Минск, Республика Беларусь, 220072

Автор для переписки: artm.shummk@gmail.com

1. Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, 27 Akademicheskaya St., Minsk, Belarus, 220072.

Получено: 12.10.2025

Принято к публикации: 23.11.2025

Опубликовано: 30.12.2025

EDN: XAJONR

DOI: 10.65189/2949-0758-2025-4-2-30-37

Аннотация

Эта работа посвящена разбору и сравнению различных подходов в изготовлении микрофлюидных устройств для анализа и исследования систем гемостаза. Описываются основные подходы как в их производстве, так и в их последующих модификациях. При анализе процессов гемостаза необходимо учитывать многие аспекты для грамотного изучения всех процессов, влияющих на него. Выбор материала микрофлюидной камеры определяет методы подготовки и функционализации поверхности, влияющие на адгезию и активацию тромбоцитов. Геометрия каналов отвечает не только за контроль потока, но и за корректное механическое взаимодействие клеток крови с поверхностью. Дополнительная модификация поверхности создаёт условия максимально приближенно к физиологическим.

Ключевые слова: Микрофлюидные устройства; Гемостаз; Функционализация поверхности; Биомедицинские исследования; Анализ крови.

Annotation

This paper examines and compares various approaches to the fabrication of microfluidic devices for the analysis and investigation of hemostasis systems. It describes the main methods both for their production and for their subsequent modification. When analyzing hemostasis, it is necessary to take into account many aspects for a proper study of all processes influencing it. The choice of the microfluidic chamber material determines the methods of surface treatment and functionalization, which affect platelet adhesion and activation. The geometry of the channels is responsible not only for flow control but also for the correct mechanical

interaction of blood cells with the surface. Additional surface modification - creating conditions as close as possible to physiological ones.

Key words: Microfluidic devices; Hemostasis; Surface functionalization; Biomedical research; Blood analysis.

Введение

В настоящее время микрофлюидные системы применяются для решения широкого круга биологических задач, в том числе и исследования системы гемостаза. Использование микрофлюидных каналов позволяет максимально приблизить условия эксперимента к процессам *in vivo*: учесть влияние окружения и механического воздействия на клетки крови. Благодаря возможности контроля множества параметров — скорость потока, химическая среда, клеточное окружение, геометрия и др., микрофлюидные устройства находят применение в биомедицинских исследованиях для диагностики патологических процессов, скрининге лекарственных препаратов, а также фундаментальных биофизических исследованиях.

Цель настоящего обзора — систематизировать существующие подходы к созданию микрофлюидных камер, сравнить используемые материалы, технологии сборки и методы функционализации поверхностей.

Дизайн камеры

Первым этапом конструирования микрофлюидной камеры является разработка ее геометрической модели и моделирование гидродинамических потоков, обеспечивающих требуемые условия функционирования системы. Для создания 3D-модели и проведения

расчетов используются CAD-системы, такие как SolidWorks, FreeCAD, AutoCAD и др., в сочетании с программами для математического моделирования физических процессов — COMSOL Multiphysics, Elmer, ANSYS Fluent, OpenFOAM и другими.

Ключевой особенностью микрофлюидных систем является наличие в них ламинарного потока жидкости, что и обеспечивает высокую степень контроля и гарантирует воспроизводимость эксперимента.

Однако, ламинарный режим течения имеет ряд недостатков, одним из которых являются сложности со смешиванием жидкостей: из-за слабых диффузионных потоков процесс перемешивания протекает медленно. Для решения этой проблемы разрабатываются различные геометрические конфигурации микроканалов, обеспечивающие улучшение эффективности смешивания. Например, самым простым и распространенным вариантом является добавление s-образного канала.

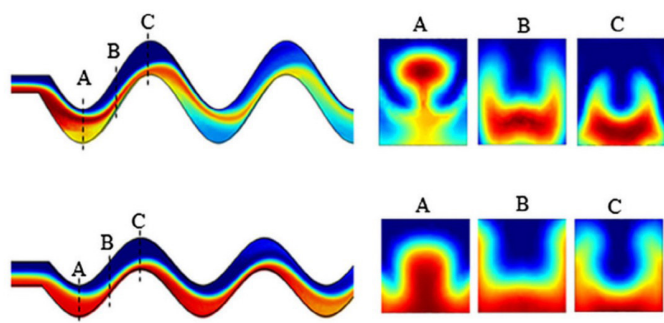


Рисунок 1. Пример распределения концентрации жидкости в S-образном микроканале в различных точках потока (A, B, C). Прохождение жидкости через изгибы способствует лучшему смешиванию в условиях ламинарного течения [1].

Среди недостатков также следует отметить возможное влияние изгибов и поворотов каналов, сопровождающихся изменением локальных скоростей потока. При проектировании камеры необходимо учитывать не только гидродинамические характеристики, но и свойства исследуемых объектов, так как излишнее усложнение геометрии может привести к искажению экспериментальных данных. Так, при изучении процессов гемостаза резкие изменения направления потока способны индуцировать механическую активацию тромбоцитов, что в свою очередь может привести к неконтролируемому образованию тромбоцитарных агрегатов и существенно исказить результаты эксперимента [2, 3].

Таким образом, создание корректной геометрии является одним из важнейших этапов в процессе конструирования микрофлюидных камер. Использование сложных геометрических

конфигураций требует более точного контроля параметров системы и существенно затрудняет анализ и интерпретацию полученных данных.

Выбор материалов

На данный момент основными материалами для изготовления микрофлюидных камер, применяемых в исследованиях систем гемостаза, являются: стекло, полидиметилсилоксан (ПДМС), Термопластики \-(полиметил\-метакрилат - PMMA, циклоолефиновые сополимеры и полимеры - СОС/СОР и др.), а также бумажные материалы. Однако камеры, изготовленные на основе бумажных субстратов, непригодны для исследовательских работ, поскольку они обладают низкой механической прочностью, не обеспечивают стабильности гидродинамических параметров и не допускают точного контроля условий эксперимента [4]. Ниже будут рассмотрены основные типы материалов микрофлюидных камер для анализа гемостаза и примеры их применения.

Выбор материалов напрямую определяется спецификой экспериментальной задачи. От выбранных материалов будут зависеть такие характеристики, как точность формирования каналов, устойчивость к давлению и деформации, оптические свойства, газопроницаемость и биосовместимость.

Стекло

Стекло является “золотым стандартом” для производства микрофлюидных устройств как в качестве подложек, так и в качестве основного материала для формирования камер. Основные преимущества стекла – высокая оптическая прозрачность, химическая инертность, биосовместимость, термостойкость, механическая прочность, долговечность и возможность многократного использования.

Однако, у камер из стекла есть ряд значимых ограничений. Во-первых, формировать сложную геометрию каналов из стекла значительно труднее, чем из полимеров. Это трудоемкий процесс, требующий использования дорогостоящего оборудования и сложных технологий: химическое травление, лазерную обработку. Во-вторых, клетки крови при адгезии к стеклянной поверхности могут активироваться: прямой контакт тромбоцитов со стеклом приводит к их адгезии и активации [5]. Чтобы избежать нежелательной активации используют методы модификации поверхностей: покрытие белками (альбумин, фибриноген и др.) [6], различными полимерами [7]. В-третьих, следует учитывать низкую газопроницаемость стекла. Микрофлюидные камеры из стекла не подходят

для проведения длительных экспериментов, в которых для обеспечения жизнеспособности клеток необходимо поддержание парциального давления газов. Однако для исследования гемостаза, обычная продолжительность эксперимента, как правило не превышает 30-40 мин, поэтому низкая газопроницаемость стекла не оказывает существенного влияния на экспериментальные данные [8].

Один из примеров использования стеклянной микрофлюидной камеры представлен в работе [9]. Авторы продемонстрировали, что нейтрофилы, адгезированные к поверхности, покрытой фибриногеном, способствуют формированию фибринового матрикса при низких значениях сдвигового напряжения. Нейтрофилы, связываясь с короткими фибриновыми структурами, инициируют прокоагулянтную активность тромбоцитов через протеазы—эластазу и катепсин G, что приводит к усиленной полимеризации фибрина в условиях, ассоциированных с венозным тромбозом и воспалением. В работе [10] с помощью стеклянных микрофлюидных камер показана роль киназы JNK1 тромбоцитов в гемостазе и тромбообразовании: у мышей с её дефицитом удлинялось время кровотечения, снижалась агрегация тромбоцитов и замедлялось формирование тромбов. Нарушение секреции тромбоцитов при низких дозах агонистов приводило к ослабленной активации интегрин $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ через путь с участием протеинкиназы C, что подтверждает значимость JNK1 для роста тромба *in vivo*.

ПДМС

Наибольшее применение полидиметилсилоксан (ПДМС) получил в биомедицинских исследованиях за счет сочетания высокой биосовместимости, оптической прозрачности, легкости в обработке и газопроницаемости. Данные свойства делают камеры, собранные из ПДМС оптимальными для работы с биологическими объектами.

Одним из недостатков ПДМС является его способность набухать при контакте с органическими растворителями, например, гексаны, эфир или триэтиламин [11], которые используют для модификации поверхности каналов с целью их гидрофилизации и иммобилизации белковых молекул. Диффузия молекул растворителя в матрицу ПДМС может приводить к ее разбуханию, повышенной шероховатости, деформации поперечного сечения, снижению механической прочности. Не смотря на то, что перед проведением экспериментов в микрофлюидной камере, органический растворитель тщательно вымывают, чтобы исключить его влияние на результаты исследования, небольшие изменения

микрорельефа и формы каналов, вследствие деформации ПДМС могут повлиять на адгезию тромбоцитов и распределение сдвигового напряжения.

Также следует отметить, что ПДМС - мягкий материал, работа с ним должна проводиться при контроле за температурой и давлением, чтобы не вызвать деформации и, следовательно, утечек жидкости из камеры, также одним из основных минусов в работе с ПДМС является необходимость ручной сборки: начиная от заливки, требующей длительного времени затвердевания, заканчивая его обработкой, такой как создание входных и выходных отверстий и фасок, и сборкой, что ограничивает массовое производство таких систем.

В качестве примера использования микрофлюидной камеры из ПДМС для анализа гемостаза приведем работу [12]. Авторами описаны два микрофлюидных устройства, позволяющих исследовать динамическую адгезию тромбоцитов к белкам внеклеточного матрикса при различных уровнях сдвигового напряжения, используя менее 100 мкл цельной крови. Показано, что отсутствие интегрин $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ нарушает адгезию тромбоцитов при всех режимах потока, тогда как мутация его внутриклеточного домена снижает адгезию только при умеренных и высоких сдвиговых напряжениях.

Дополнительно представлен микрофлюидный проточный тест, позволяющий количественно оценивать функцию тромбоцитов с использованием минимального объема цельной крови (50 мкл) [13]. С помощью микроконтактной печати были сформированы коллагеновые тонкие плёнки размером 20, 50 и 100 мкм (около 300 областей) и показано, что стабильная адгезия тромбоцитов при физиологических скоростях сдвига в диапазоне $50-920 \text{ c}^{-1}$ возможна только на областях более 20 мкм, что указывает на существование порогового размера повреждения, необходимого для устойчивой адгезии тромбоцитов в условиях потока.

Термопластики

Ещё одним классом материалов для производства микрофлюидных устройств являются термопластики: полиметилметакрилат (PMMA), полистирол (PS), поликарбонат (PC), сополимеры (COC). Основными преимуществами термопластиков являются низкая стоимость, оптическая прозрачность и биосовместимость. Широкое их распространение обусловлено технологической доступностью и возможностью серийного производства.

Однако, данный материал уступает ПДМС в возможностях поверхностной функционализации, что ограничивает их использование для

Материал	n_D	T размягч., °C	Контактный угол, °	Пропускание, %	Ссылки
<i>Боросиликатное стекло</i>					
	1.473	~450–600	~25 ± 5	>90	[16, 17, 18, 19, 20, 21]
<i>Отверждённый ПДМС</i>					
	1.40	~120	~108 ± 7	>90	[22, 23, 24, 25, 26, 27, 28]
<i>Термопласты</i>					
PMMA	1.5–1.9	~60–90	~68–80	>80	[29, 30, 31, 32, 33, 34, 35]
PC	1.58	~120	~80–90	>90	[36, 37, 38, 39, 40, 41, 42]
PS	1.59	~100	~85	>90	[43, 44]
COC	1.52	~170–200	~90	>90	[43, 45, 46, 44]

Таблица 1. Типичные оптические и физические свойства материалов для микрофлюидики.

исследования биологических объектов. Среди недостатков можно также отметить низкую термостабильность по сравнению с ПДМС и стеклом, а также низкую газопроницаемость.

В работах [10, 14] оптимизированы микрофлюидные системы для исследования взаимодействия цельной крови с наноструктурированными полимерными поверхностями в условиях потока, а так же было проведено сравнение выживаемости клеток крови в условиях течения в микрофлюидных камерах. Показано, что увеличение размеров нанорельефа на плёнках из полиметилметакрилата снижает скорость кровотока, усиливает адгезию и спрединг тромбоцитов, а также адсорбцию фактора фон Виллебранда, но уменьшает адсорбцию фибриногена [15].

Технологии изготовления микрофлюидных камер

Точность, воспроизводимость и надёжность экспериментальных данных напрямую зависят как от выбранного материала микрофлюидной камеры, так и от применяемой технологии её изготовления. На сегодняшний день основными методами формирования микрофлюидных каналов являются мягкая литография, микрофрезеровка и горячее тиснение.

Для производства камер из ПДМС методом мягкой литографии необходимо изготовление фотошаблона состоящего из подложки и нанесенной на нее фоторезиста, который в последующем будет служить основой для заливки ПДМС [47]. Метод позволяет воспроизводить геометрию с масштабами до нанометров.

Микрофрезеровка и лазерная абляция представляют собой методы формирования микрофлюидных каналов, основанные на механической или лазерной обработке и удалении материала для достижения необходимой геометрии. Эти подходы применимы к термопластикам и стеклу и позволяют производить камеры с высоким разрешением и

точностью переноса геометрических параметров [48]. Основным ограничением является необходимость использования дорогостоящего оборудования.

Горячее тиснение используется для изготовления камер из термопластиков. Для этого предварительно создаётся пресс-форма, рельеф которой под действием давления и высокой температуры переносится на поверхность термопластика, формируя требуемую конфигурацию каналов с высокой точностью и повторяемостью [49].

Методы герметизации и сборки микрофлюидных устройств

Плазменная и термическая обработки

Одним из наиболее широко применяемых методов герметизации является активация поверхности при помощи плазменной или термической обработки. Эти методы подходят для материалов содержащих кремний, таких как стекло и полидиметилсилоксан.

При взаимодействии плазмы и высоких температур на поверхности кремний-содержащих материалов происходит разрыв кремний-кислородных связей и образование гидроксильных групп, которые и позволяют при последующем контакте двух материалов образовывать между ними ковалентные Si-O-Si связи [50].

Для достижения равномерного образования связей на поверхности необходимо тщательно подбирать температурные условия, чтобы не повредить поверхность. Кроме того, активация поверхности обладает ограниченной продолжительностью, в связи с чем процесс склеивания материалов должен проводиться сразу после их активации для достижения надежного соединения.

Адгезивные пленки

Адгезивные плёнки выступают в качестве промежуточного слоя между подложкой и

микрофлюидной камерой [51]. Они обеспечивают надёжное механическое соединение компонентов и герметичность каналов без необходимости применения высоких температур или химических реакций.

Чаще всего адгезивные слои изготавливаются на основе акриловых, силиконовых или эпоксидных полимеров, обладающих хорошей прозрачностью, гибкостью и химической стойкостью.

Одним из преимуществ адгезивных плёнок является возможность их применения для соединения материалов с разными коэффициентами теплового расширения (например, ПДМС и стекла, ПДМС и ПММА), где термическое связывание может привести к деформации.

Кроме того, использование таких плёнок может влиять на свойства поверхностей — например, на гидрофобность каналов и возможность последующей химической функционализации.

Ковалентная сшивка

Ковалентная сшивка основана на химической активации поверхностей и последующем образовании прочных ковалентных связей между ними [52, 53].

Этот метод обеспечивает максимально надёжное и долговечное соединение, устойчивое к высоким температурам, органическим растворителям и механическим нагрузкам.

Чаще всего ковалентная сшивка применяется при работе со стеклянными или кремниевыми подложками, а также при связывании ПДМС со стеклом. В качестве примеров ковалентного присоединения можно отметить амин–эпоксидную реакцию (APTES+стекло/ПДМС–GPTMS+стекло/ПДМС), тиол–эпоксидное сшивание (MPTMS+стекло/ПДМС–GPTMS+стекло/ПДМС), используемое для связывания ПДМС с стеклом, а также использование раствора Пираньи для прямой функционализации стекла и образования ковалентной сшивки в камерах стекло-стекло,

для работы с ПДМС такой вариант не подходит т.к. разрушает его.

Подходы к модификации поверхности каналов

Для исследования процессов гемостаза кроме самой конструкции микрофлюидной камеры с подходящей геометрией и материалами, важно осуществить функционализацию поверхности для иммобилизации молекул адгезии и активации тромбоцитов. Существует множество способов функционализации поверхности в зависимости от типа материала микрофлюидной камеры. Основные из них представлены в таблице 2.

Оба силана APTES и GLYMO связываются с заранее активированной поверхностью (поверхностью с образованными на ней -ОН группами за счет термической или химической обработки) через силановые группы. Последующее присоединение белков происходит различными способами, в отличие от GLYMO который имеет высокорекреакционные группы и может без дополнительных стадий присоединять к себе белок, APTES нуждается в последующей активации при помощи EDC/NHS/GA, такая обработка является мостиком между APTES и белком за счет образования шиффовых оснований.

Использование коммерческих микрофлюидных устройств для анализа гемостаза

Как уже упоминалось выше, существует возможность модификации поверхности микрофлюидных каналов для более точного воспроизведения физиологических условий и, соответственно, для более детального моделирования процессов, происходящих в организме. Важным преимуществом таких систем является и то, что в них можно задавать физиологические скорости и режимы потока, соответствующие тем, что наблюдаются в различных типах сосудов. Так, например, при моделировании патофизиологических состояний,

Метод	Связь	Преимущества	Недостатки	Ссылки
GLYMO + белок	Ковалентная	Одностадийная модификация; возможно паттернирование поверхности	Маскирование при обработке плазмой может быть неточным	[54]
APTES + EDC/NHS/GA + белок	Ковалентная	Простая поверхностная модификация; возможен паттернинг	Маскирование при плазменной обработке может быть неточным	[55]
Ламинин	Нековалентная	Простота и скорость метода	Возможность удаления биомолекул из-за отсутствия ковалентной связи	[56]
Прямая адсорбция белков	Нековалентная	Простота и скорость метода	Возможность удаления биомолекул из-за отсутствия ковалентной связи	[57]

Таблица 2. Методы связи и иммобилизации биомолекул в микрофлюидных устройствах.

связанных с повреждением эндотелиального слоя, на поверхность камеры наносят белки субэндотелиального матрикса, такие как коллаген или vWF [58]. Это позволяет в реальном времени наблюдать взаимодействие тромбоцитов с указанными белками, исследовать механизмы активации и так же использовать такие системы в диагностических целях для последующего выстраивания индивидуального подхода к лечению пациентов.

Одним из производителей микрофлюидных камер, которые выработали подходы к грамотному конструированию и модификации таких чипов является компания ibidi (Германия) [59]. Все это свидетельствует о высокой пригодности применения коммерческих камер для исследования и анализа гемостаза.

Заключение

Все рассмотренные методы конструирования микрофлюидных камер позволяют создавать конструкции, максимально приближенные к физиологическим условиям. Это обеспечивает проведение высококачественных исследований, направленных не только на изучение внутренних механизмов гемостаза, но и на разработку камер, подходящих для использования в диагностике и анализе эффективности лекарственных препаратов.

Благодарности

Авторы выражают благодарность заведующей лабораторией медицинской биофизики ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», к.б.н. Шамовой Е.В. за участие в обсуждении и полезные рекомендации при подготовке статьи.

Список используемых сокращений

GLYMO - (3-Глицидилоксипропил) триметоксисилан

GA - Глутаровый диальдегид

NHS - N-Гидроксисукцинимид

APTES - (3-Аминопропил)триэтоксисилан

EDC - 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид

MPTMS - 3-Меркаптопропилтриметоксисилан

GPTMS - 3-Глицидилоксипропилтриметоксисилан

Список литературы

1. Chia Yen Lee и др. "Passive mixers in microfluidic systems: A review". В: Chemical Engineering Journal 288 (март 2016), с. 146–160. issn: 1385-8947. doi: 10.1016/j.cej.2015.10.122.
2. Yunduo Charles Zhao и др. "Hemodynamic Analysis for Stenosis Microfluidic Model of Thrombosis with Refined Computational Fluid Dynamics Simulation". В: Scientific Reports 11.1 (март 2021), с. 6875. issn: 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-021-86310-2.
3. Abhishek Jain и др. "A Shear Gradient-Activated Microfluidic Device for Automated Monitoring of Whole Blood Haemostasis and Platelet Function". В: Nature Communications 7.1 (январь 2016), с. 10176. issn: 2041-1723. doi: 10.1038/ncomms10176.
4. Hosub Lim, Ali Turab Jafry и Jinkee Lee. "Fabrication, Flow Control, and Applications of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices". В: Molecules 24.16 (авг. 2019), с. 2869. issn: 1420-3049. doi: 10.3390/molecules24162869.
5. Alessia Donati, Swati Gupta и Ilya Reviakine. "Subpopulations in purified platelets adhering on glass". В: Biointerphases 11.2 (июнь 2016). issn: 1934-8630. doi: 10.1116/1.4953866.
6. K. Park, F. W. Mao и H. Park. "Morphological characterization of surface-induced platelet activation". В: Biomaterials 11.1 (январь 1990), с. 24–31. issn: 0142-9612. doi: 10.1016/0142-9612(90)90047-T.
7. Oldřich Neděla, Petr Slepíčka и Václav Svorčík. "Surface Modification of Polymer Substrates for Biomedical Applications". В: Materials 10.10 (сентябрь 2017), с. 1115–1137. issn: 1996-1944. doi: 10.3390/ma10101115.
8. Sophie V. L. Leonard и др. "Oxygen Concentration Plays a Critical Role in Fibrinogen-Mediated Platelet Activation via Inactivation of $\alpha IIb\beta 3$ and Modulation of Fibrinogen". В: Biomolecules 15.4 (март 2025), с. 501. issn: 2218-273X. doi: 10.3390/biom15040501.
9. Mukul S. Goel и Scott L. Diamond. "Neutrophil Enhancement of Fibrin Deposition Under Flow Through Platelet-Dependent and -Independent Mechanisms". В: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 21.12 (декабрь 2001), с. 2093–2098. issn: 1079-5642. doi: 10.1161/hq1201.100255.
10. Heta Jigar Panchal и др. "Microfluidics in Haemostasis: A Review". В: Molecules 25.4 (февраль 2020), с. 833. issn: 1420-3049. doi: 10.3390/molecules25040833.
11. Jessamine Ng Lee, Cheolmin Park и George M. Whitesides. "Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices". В: Analytical Chemistry 75.23 (декабрь 2003), с. 6544–6554. issn: 0003-2700. doi: 10.1021/ac0346712.
12. Ryan R. Hansen и др. "High Content Evaluation of Shear Dependent Platelet Function in a Microfluidic Flow Assay". В: Annals of Biomedical Engineering 41.2 (февраль 2013), с. 250–262. issn: 1573-9686. doi: 10.1007/s10439-012-0658-5.

13. Edgar Gutierrez и др. "Microfluidic Devices for Studies of Shear-Dependent Platelet Adhesion". В: Lab on a Chip 8.9 (сент. 2008), с. 1486–1495. issn: 1473-0189. doi: 10.1039/b804795b.
14. Ozan Panatli и др. "Cost-Effective and Simple Prototyping PMMA Microfluidic Chip and Open-Source Peristaltic Pump for Small Volume Applications". В: Micro 5.2 (февр. 2025), с. 25. issn: 2673-8023. doi: 10.3390/micro5020025.
15. Caterina Minelli и др. "A Micro-Fluidic Study of Whole Blood Behaviour on PMMA Topographical Nanostructures". В: Journal of Nanobiotechnology 6.1 (2008), с. 3. issn: 1477-3155. doi: 10.1186/1477-3155-6-3.
16. Pascal Richet и др. "Configurational heat capacity and entropy of borosilicate melts". В: Journal of Non-Crystalline Solids 211.3 (апр. 1997), с. 271–280. issn: 00223093. doi: 10.1016/S0022-3093(96)00646-1.
17. Linfeng Ding и др. "Effect of pressure and temperature on viscosity of a borosilicate glass". В: Journal of the American Ceramic Society 101.9 (сент. 2018), с. 3936–3946. issn: 0002-7820. doi: 10.1111/jace.15588.
18. К. Т. Тан и др. "Fundamentals of Adhesion Failure for a Model Adhesive (PMMA/Glass) Joint in Humid Environments". В: The Journal of Adhesion 84.4 (апр. 2008), с. 339–367. issn: 0021-8464. doi: 10.1080/00218460802004428.
19. Ann Louise Sumner и др. "The Nature of Water on Surfaces of Laboratory Systems and Implications for Heterogeneous Chemistry in the Troposphere". В: Physical Chemistry Chemical Physics 6 (2004), с. 604–613. issn: 1463-9076. doi: 10.1039/b308125g.
20. Yuanzheng Yue, Manzila I. Tuheen и Jincheng Du. "Borosilicate Glasses". В: Encyclopedia of Materials: Technical Ceramics and Glasses. Elsevier, 2021, с. 519–539. doi: 10.1016/B978-0-12-818542-1.00098-9.
21. Jiawei Luo и др. "Complex Refractive Index of Silica, Silicate, Borosilicate, and Boroaluminosilicate Glasses – Analysis of Glass Network Vibration Modes with Specular-Reflection IR Spectroscopy". В: Journal of Non-Crystalline Solids 494 (авг. 2018), с. 94–103. issn: 0022-3093. doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2018.04.050.
22. Dow. SYLGARD 184 Silicone Elastomer Technical Data Sheet. Тех. отч. 2017.
23. Shuwen Hu и др. "Tailoring the Surface Properties of Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Devices". В: Langmuir 20.13 (июнь 2004), с. 5569–5574. issn: 0743-7463. doi: 10.1021/la049974l.
24. Томоо Tsuzuki и др. "Hydrophobic Recovery of PDMS Surfaces in Contact with Hydrophilic Entities: Relevance to Biomedical Devices". В: Materials 15.6 (март 2022), с. 2313. issn: 1996-1944. doi: 10.3390/ma15062313.
25. Linda Rudmann и др. "Fabrication and Characterization of PDMS Waveguides for Flexible Optodes". В: Advanced Healthcare Materials 13.16 (июнь 2024). issn: 2192-2640. doi: 10.1002/adhm.202304513.
26. Anna Paterova и др. "Measurement of Infrared Optical Constants with Visible Photons". В: New Journal of Physics 20.4 (апр. 2018), с. 043015. issn: 1367-2630. doi: 10.1088/1367-2630/aab5ce.
27. Saul Utrera-Barrios, Liyun Yu и Anne Ladegaard Skov. "Revisiting the Thermal Transitions of Polydimethylsiloxane (PDMS) Elastomers: Addressing Common Misconceptions with Comprehensive Data". В: Macromolecular Materials and Engineering 310.8 (авг. 2025). issn: 1438-7492. doi: 10.1002/mame.202500075.
28. Enrico Drioli и Lidietta Giorno, ред. Encyclopedia of Membranes. Springer Berlin Heidelberg, 2016. isbn: 978-3-642-40872-4. doi: 10.1007/978-3-642-40872-4.
29. Weilong Wu и др. "Optical and Thermal Properties of Polymethyl Methacrylate (PMMA) Bearing Phenyl and Adamantyl Substituents". В: Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 653 (нояб. 2022), с. 130018. issn: 0927-7757. doi: 10.1016/j.colsurfa.2022.130018.
30. Lamis Faaz Nassier и Mohammed Hadi Shinen. "Study of the Optical Properties of Poly(methyl methacrylate) (PMMA) by Using Spin Coating Method". В: Materials Today: Proceedings 60 (2022), с. 1660–1664. issn: 2214-7853. doi: 10.1016/j.matpr.2021.12.213.
31. С. Y. Zhi и др. "Mechanical and Thermal Properties of Polymethyl Methacrylate–BN Nanotube Composites". В: Journal of Nanomaterials 2008.1 (январь 2008), с. 642036. issn: 1687-4110. doi: 10.1155/2008/642036.
32. Hafsa Naznin и др. "Enhancement of Thermal and Mechanical Properties of PMMA Composites by Incorporating Mesoporous Micro-Silica and GO". В: Results in Materials 11 (сент. 2021), с. 100203. issn: 2590-048X. doi: 10.1016/j.rinma.2021.100203.
33. Ghaleb Al-Dahash и др. "Article in Academic Research International". В: Academic Research International (2014). issn: 2223-9944. url: <http://www.savap.org.pk/journals.html>.
34. Stanislaw Pogorzelski и др. "Wettability, Adsorption and Adhesion in Polymer (PMMA)–Commercially Available Mouthrinse System". В: Materials 16.17 (сент. 2023), с. 5753. issn: 1996-1944. doi: 10.3390/ma16175753.
35. Ying Ma и др. "Fabrication of Super-Hydrophobic Film from PMMA with Intrinsic Water Contact Angle below 90 degree". В: Polymer 48.26 (дек. 2007), с. 7455–7460. issn: 0032-3861. doi: 10.1016/j.polymer.2007.10.038.
36. Pawel Jankowski и др. "Hydrophobic Modification of Polycarbonate for Reproducible and Stable Formation of Biocompatible Microparticles". В: Lab on a Chip 11.4 (2011), с. 748–752. issn: 1473-0197. doi: 10.1039/C0LC00360C.
37. Sabri Alamri, Alfredo I. Aguilar-Morales и Andrés F. Lasagni. "Controlling the Wettability of Polycarbonate Substrates by Producing Hierarchical Structures Using Direct Laser Interference Patterning". В: European Polymer Journal 99 (февр. 2018), с. 27–37. issn: 0014-

3057. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.12.001.
38. Nidhi Shekhawat. "Refractive Index Engineering in Polycarbonate Implanted by 100 keV N+ Ions". В: *Optical Engineering* 50.4 (апр. 2011), с. 044601. issn: 0091-3286. doi: 10.1117/1.3562325.
 39. Chandrinou Aristeidis и Aristeidis Chandrinou. "A Review of Polymers and Plastic High Index Optical Materials". В: *Journal of Materials Science Research and Reviews* 7.4 (2021), с. 1–14. issn: 2589-9999.
 40. Shug-June Hwang и Hsin Her Yu. "Novel Cyclo Olefin Copolymer Used as Waveguide Film". В: *Japanese Journal of Applied Physics* 44.4S (апр. 2005), с. 2541. issn: 0021-4922. doi: 10.1143/JJAP.44.2541.
 41. Polycarbonate Data Sheet. url: <https://www.directplastics.co.uk/pdf/datasheets/Polycarbonate%20Data%20Sheet.pdf> (дата обр. 13.09.2025).
 42. Manufacturing On Demand Data Sheet: PC-ISO Polycarbonate Details. Тех. отч. Xometry. url: <https://www.xometry.de> (дата обр. 13.09.2025).
 43. Abdulrahman Agha и др. "A Review of Cyclic Olefin Copolymer Applications in Microfluidics and Microdevices". В: *Macromolecular Materials and Engineering* 307.8 (авг. 2022), n/a. issn: 1438-7492. doi: 10.1002/mame.202200053.
 44. H. Gausepohl и N. Nießner. "Polystyrene and Styrene Copolymers". В: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. Elsevier, 2001, с. 7735–7741. doi: 10.1016/B0-08-043152-6/01389-9.
 45. TOPAS® COC Cyclic Olefin Copolymer. Тех. отч. TOPAS Advanced Polymers.
 46. Michael F. Ashby. "Material Profiles". В: *Materials and the Environment*. Elsevier, 2013, с. 459–595. doi: 10.1016/B978-0-12-385971-6.00015-4.
 47. Younan Xia и George M. Whitesides. "Soft Lithography". В: *Annual Review of Materials Science* 28 (1998), с. 153–184. doi: 10.1146/annurev.matsci.28.1.153.
 48. Emanuel A. Waddell. "Laser Ablation as a Fabrication Technique for Microfluidic Devices". В: *Microfluidic Techniques*. New Jersey: Humana Press, 2006, с. 27–38. doi: 10.1385/1-59259-997-4:27.
 49. Rean-Der Chien. "Hot Embossing of Microfluidic Platform". В: *International Communications in Heat and Mass Transfer* 33.5 (май 2006), с. 645–653. issn: 0735-1933. doi: 10.1016/j.icheatmasstransfer.2006.01.017.
 50. Mie Tohnishi и Akihiro Matsutani. "Surface treatment of polydimethylsiloxane and glass using solid-source H₂O plasma for fabrication of microfluidic devices". В: *Sensors and Materials* 33.2 (февр. 2021), с. 569–574. issn: 0914-4935. doi: 10.18494/SAM.2021.3156.
 51. Chia-Wen Tsao и Wan-Ci Syu. "Bonding of Thermoplastic Microfluidics by Using Dry Adhesive Tape". В: *RSC Advances* 10.51 (сент. 2020), с. 30289–30296. issn: 2046-2069. doi: 10.1039/D0RA05876A.
 52. Cyrus Weijie Beh, Weizhuang Zhou и Tza-Huei Wang. "PDMS–glass bonding using grafted polymeric adhesive – alternative process flow for compatibility with patterned biological molecules". В: *Lab on a Chip* 12.20 (2012), с. 4120–4126. issn: 1473-0197. doi: 10.1039/c2lc40315c.
 53. Alexandra Boršok, Kristof Laboda и Attila Bonyár. "PDMS Bonding Technologies for Microfluidic Applications: A Review". В: *Biosensors* 11.8 (авг. 2021), с. 292. issn: 2079-6374. doi: 10.3390/bios11080292.
 54. Suruk Udomsom и др. "Novel Rapid Protein Coating Technique for Silicon Photonic Biosensor to Improve Surface Morphology and Increase Bioreceptor Density". В: *Coatings* 11.5 (май 2021), с. 595. issn: 2079-6412. doi: 10.3390/coatings11050595.
 55. Shivani Sathish и др. "Microcontact Printing with Aminosilanes: Creating Biomolecule Micro- and Nanoarrays for Multiplexed Microfluidic Bioassays". В: *Lab on a Chip* (2023). doi: 10.1039/b000000x.
 56. Dohyun Kim и Amy E. Herr. "Protein Immobilization Techniques for Microfluidic Assays". В: *Biomicrofluidics* 7.4 (июль 2013). issn: 1932-1058. doi: 10.1063/1.4816934.
 57. Bridget Milky и др. "Long-Term Adherence of Human Brain Cells in vitro Is Enhanced by Charged Amine-Based Plasma Polymer Coatings". В: *Stem Cell Reports* 17.3 (март 2022), с. 489–506. issn: 2213-6711. doi: 10.1016/j.stemcr.2022.01.013.
 58. Lucas H. Ting и др. "Contractile forces in platelet aggregates under microfluidic shear gradients reflect platelet inhibition and bleeding risk". В: *Nature Communications* 10.1 (март 2019), с. 1204. issn: 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-019-09150-9.
 59. Joshua H. Bourne и др. "CLEC-2 Supports Platelet Aggregation in Mouse but not Human Blood at Arterial Shear". В: *Thrombosis and Haemostasis* 122.12 (дек. 2022), с. 1988–2000. issn: 0340-6245. doi: 10.1055/a-1896-6992.