

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Денис Ребриков, д. б. н.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА Александр Эттингер, д. м. н.

РЕДАКТОРЫ Валентина Гейдебрект, Лилия Егорова

КОРРЕКТОР Ольга Комар

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

М. Р. Богомильский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор. (Москва, Россия)

В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

В. К. Боженко, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)

Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)

Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)

Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)

А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)

Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

А. А. Иванов, к. м. н. (Москва, Россия)

Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)

Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)

М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)

С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)

А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)

Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

А. Спаллоне, д. м. н., профессор (Рим, Италия)

В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)

С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Х. П. Тахчиди, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

М. Л. Филипенко, к. б. н., в. н. с. (Новосибирск, Россия)

Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)

Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Л. Н. Шишкина, д. б. н., с. н. с. (Новосибирск, Россия)

Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ <http://vestnikrgmu.ru/login>

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru

АДРЕС РЕДАКЦИИ ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включён в Scopus с 2017 года



Журнал включён в WoS с 2018 года



Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 3



Журнал включён в РИНЦ, IF 2014: 0,139



Журнал включён в Перечень 27.01.2016 (№ 1760)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Здесь находится открытый архив журнала



Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International www.creativecommons.org



Подписано в печать 30.06.2018
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL
RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc

EDITORS Valentina Geidebrekht, Liliya Egorova

PROOF-READER Olga Komar

TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova, Vyacheslav Vityuk

EDITORIAL BOARD

Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)

Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)

Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)

Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)

Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)

Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Ivanov AA, CSc (Moscow, Russia)

Kzyshkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)

Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)

Lebedev MA, PhD (Darem, USA)

Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)

Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Spallone A, DSc, professor (Rome, Italy)

Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)

Takhchidi KhP, corr. member of RAS, DSc (medicine), professor (Moscow, Russia)

Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)

Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)

Khazipov RN, DSc (Marsel, France)

Shimanovskii NL, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)

Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

SUBMISSION <http://vestnikrgmu.ru/login?lang=en>

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

ADDRESS ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997

Indexed in Scopus since 2017

Scopus®

Indexed in RSCI. IF 2016: 0,174

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU

Indexed in WoS since 2018

WEB OF SCIENCE™

Listed in HAC 27.01.2016 (no. 1760)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Five-year h-index is 3

Google
scholar

Open access to archive

CYBERLENINKA

The mass media registration certificate no. 012769 issued on July 29, 1994

Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org



Approved for print 30.06.2018
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР

5

CRISPR-Cas системы *Mycobacterium tuberculosis*: структура модуля, изменение в процессе эволюции у различных линий, возможная роль в формировании вирулентности и лекарственной устойчивости
М. В. Зайчикова, Н. В. Захаревич, М. С. Чекалина, В. Н. Даниленко

CRISPR-Cas systems of *Mycobacterium tuberculosis*: the structure, transformation in different lineages in the process of evolution and a possible role in the formation of virulence and drug resistance
Zaychikova MV, Zakharevich NV, Chekalina MS, Danilenko VN

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

15

Экспериментальные подходы к таргетному редактированию гена *CFTR* с помощью CRISPR-Cas9
С. А. Смирнихина, А. А. Анучина, К. С. Кочергин-Никитский, Э. П. Адильгереева, В. Д. Якушина, А. В. Лавров

Experimental approaches to the target editing of the *CFTR* gene using CRISPR-Cas9
Smirnikhina SA, Anuchina AA, Kochergin-Nikitsky KS, Adilgerееva EP, Yakushina VD, Lavrov AV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

22

Cas13a: получение и использование для определения вирусной РНК

А. С. Савинова, Е. Ю. Коптев, Е. В. Усачев, А. П. Ткачук, В. А. Гушчин

Cas13a: purification and use for detection of viral RNA

Savinova AS, Koptev EYu, Usachev EV, Tkachuk AP, Gushchin VA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

28

Поиск и анализ CRISPR-Cas системы в штамме *Escherichia coli* HS и детектируемых спейсерами его CRISPR-кассеты фаговых рас методами биоинформатики

Е. И. Иванова, Ю. П. Джюев, А. Ю. Борисенко, Н. П. Перетолчина, Л. А. Степаненко, А. И. Парамонов, Е. В. Григорова, У. М. Немченко, Т. В. Туник, Е. А. Кунгурцева

The search and analysis of a CRISPR-Cas system in *Escherichia coli* HS with subsequent scanning for the corresponding phage races based on the spacers of the detected CRISPR array using bioinformatic methods

Ivanova EI, Dzhioev YuP, Borisenko AYU, Peretolchina NP, Stepanenko LA, Paramonov AI, Grigorova EV, Nemchenko UM, Tunik TV, Kungurtseva EA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

35

Консервативность последовательностей генов помпы множественной лекарственной устойчивости *AcrAB-TolC Escherichia coli* как признак вовлеченности в перманентную «уборку» бактериальной клетки

М. В. Каракозова, П. А. Назаров

Conserved sequences of genes coding for the multidrug resistance pump *AcrAB-TolC* of *Escherichia coli* suggest their involvement into permanent cell "cleaning"

Karakozova MV, Nazarov PA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

40

Изменения чувствительности клеток глиобластом человека к онколитическим энтеровирусам при пассировании в культуре

А. В. Соболева, А. В. Липатова, Д. В. Кочетков, П. М. Чумаков

Changes in the sensitivity of human glioblastoma cells to oncolytic enteroviruses induced by passaging

Soboleva AV, Lipatova AV, Kochetkov DV, Chumakov PM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

45

Энтеровирусы человека проявляют избирательную онколитическую активность на модели ксенотрансплантатов мультиформной глиобластомы человека в иммунодефицитных мышах
А. О. Желтухин, А. В. Соболева, А. О. Сосновцева, Т. Х. Ле, Г. В. Ильинская, Д. В. Кочетков, А. В. Липатова, П. М. Чумаков
Human enteroviruses exhibit selective oncolytic activity in the model of human glioblastoma multiforme xenografts in immunodeficient mice
Zheltukhin AO, Soboleva AV, Sosnovtseva AO, Le TH, Ilyinskaya GV, Kochetkov DV, Lipatova AV, Chumakov PM

МЕТОД

52

Гемодинамика матки и состояние овариального резерва в оценке эффективности экстракорпорального оплодотворения
А. К. Рабаданова, Р. И. Шалина, Н. А. Гугушвили
Uterine hemodynamics and ovarian reserve quality in the prediction of in vitro fertilization outcomes
Rabadanova AK, Shalina RI, Gugushvili NA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

60

Низкотемпературная атмосферная плазма в коррекции возрастных изменений кожи лица
М. И. Шемшук, В. Н. Короткий, Д. Н. Серов, М. А. Кочетков, А. Г. Стенько, Н. Г. Короткий
Non-thermal atmospheric-pressure plasma in the anti-age therapy of facial skin
Shemshuk MI, Korotky VN, Serov DN, Kochetkov MA, Stenko AG, Korotky NG

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

67

Компетентность пластических хирургов
Н. Е. Мантурова, В. В. Кочубей, А. В. Кочубей
The competence of plastic surgeons
Manturova NE, Kochubey VV, Kochubey AV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

72

Клинико-рентгенологическая характеристика пациентов с цервикальным синдромом после травмы надплечья
Е. Б. Калинин, А. В. Черняев, Л. Ю. Слияков, А. В. Лычагин, Б. М. Калинин, Ю. Р. Гончарук
Clinical and radiographic characteristics of patients with cervicgia after previous injury to the pectoral girdle
Kalinsky EB, Chernyaev AV, Slinyakov LYu, Lychagin AV, Kalinsky BM, Goncharuk YuR

МЕТОД

77

Алгоритм хирургического лечения больных с рассекающим остеохондритом коленного сустава
К. А. Егязарян, Г. Д. Лазишвили, И. В. Храменкова, М. А. Шпак, Д. А. Бадриев
Knee osteochondritis desiccans: surgery algorithm
Egjazaryan KA, Lazishvili GD, Hramenkova IV, Shpak MA, Badriev DA

CRISPR-CAS СИСТЕМЫ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: СТРУКТУРА МОДУЛЯ, ИЗМЕНЕНИЕ В ПРОЦЕССЕ ЭВОЛЮЦИИ У РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ, ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ВИРУЛЕНТНОСТИ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

М. В. Зайчикова¹✉, Н. В. Захаревич¹, М. С. Чекалина¹, В. Н. Даниленко^{1,2}

¹ Лаборатория генетики микроорганизмов, Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова Российской академии наук, Москва

² Кафедра биоинформатики, факультет биологической и медицинской физики, Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

CRISPR-Cas системы широко распространены у бактерий и архей. Они обеспечивают адаптивный иммунитет к бактериофагам и плазмидам, а также выполняют другие функции, включая регуляцию экспрессии генов, репарацию ДНК, формирование вирулентности. Нами был проведен анализ CRISPR-Cas систем полностью секвенированных геномов *M. tuberculosis* из семи линий: Beijing, B0/W-148, EAI, Haarlem, Ural, LAM, S. Проанализированные геномы содержат CRISPR-Cas систему типа III-A. Линиям в составе вида *M. tuberculosis* свойственны различия в строении CRISPR-Cas системы, в том числе редукция части системы у линии Beijing. Для *cas*-генов нами был осуществлен поиск возможных функциональных партнеров и компенсаторных механизмов с использованием метода филогенетического профайлинга. В ходе анализа филогенетических профилей (ФП) были обнаружены гены со сходным характером эволюционных событий. Установлено, что потеря части системы CRISPR-Cas у представителей линии Beijing сопровождалась по крайней мере двумя эволюционными событиями потери и одним событием приобретения участков генома. Возможность изучения альтернативных функций CRISPR-Cas систем у *M. tuberculosis* и их предполагаемая связь с другими генными системами представляет значительный интерес.

Ключевые слова: системы CRISPR-Cas, вирулентность, *M. tuberculosis*, линия Beijing, филогенетический профайлинг

✉ **Для корреспонденции:** Зайчикова Марина Викторовна
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119991; marinaz15@yandex.ru, valerid@vigg.ru

Статья получена: 15.03.2018 **Статья принята к печати:** 20.03.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.016

CRISPR-CAS SYSTEMS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: THE STRUCTURE, TRANSFORMATION IN DIFFERENT LINEAGES IN THE PROCESS OF EVOLUTION AND A POSSIBLE ROLE IN THE FORMATION OF VIRULENCE AND DRUG RESISTANCE

Zaychikova MV¹✉, Zakharevich NV¹, Chekalina MS¹, Danilenko VN^{1,2}

¹ Laboratory of Bacterial Genetics, Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow

² Department of Bioinformatics, Faculty of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny

CRISPR-Cas systems are widespread in bacteria and archaea. They provide adaptive immunity against bacterial phages and plasmids and exert a few important functions like regulation of gene expression, DNA repair or virulence formation. We have analyzed the CRISPR-Cas systems of 7 *M. tuberculosis* lineages with fully sequenced genomes, namely Beijing, B0/W-148, EAI, Haarlem, Ural, LAM, and S. The CRISPR-Cas systems present in the analyzed genomes belong to type III-A. *M. tuberculosis* lineages differ in their CRISPR-Cas structure; in the Beijing lineage a part of the system is reduced. We have conducted a search for the functionally related partners and compensatory mechanisms of *cas*-genes using a method of phylogenetic profiling. The obtained phylogenetic profiles show that some genes have undergone similar evolutionary events. The reduction of the system's part in the Beijing lineage was accompanied by at least two evolutionary losses and one acquisition of genome regions. Exploration of alternative CRISPR-Cas functions in *M. tuberculosis* and their possible associations with other gene systems remains an exciting challenge.

Keywords: CRISPR-Cas systems, virulence, *M. tuberculosis*, Beijing lineage, phylogenetic profiling

✉ **Correspondence should be addressed:** Marina Zaychikova
Gubkina 3, Moscow, 119991; marinaz15@yandex.ru, valerid@vigg.ru

Received: 15.03.2018 **Accepted:** 20.03.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.016

CRISPR-CAS СИСТЕМЫ У БАКТЕРИЙ: СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ

В настоящее время системы CRISPR-Cas идентифицированы в геномах примерно 40% бактерий и большинства архей (90%) [1, 2]. Эти системы состоят из двух обязательных компонентов: CRISPR¹-кассет и Cas²-белков. Повторяющиеся последовательности равной длины, перемежающиеся уникальными участками (спейсерами), были описаны еще в 1987 г. в геноме *E. coli* [3], но об их роли тогда ничего не было известно. В 2000-х годах было описано участие CRISPR-Cas систем в реализации бактериального иммунитета [4, 5], а на настоящий момент уже показано их участие в целом ряде различных клеточных процессов, в том числе в процессах репарации ДНК, в регуляции экспрессии генов, в процессах вирулентности и т. д. [6]. Стоит отметить, что в геноме *M. tuberculosis* прямые повторы (direct repeats, DR) были обнаружены ещё в 1990-х годах, их полиморфизм подробно изучен, и еще до описания иммунной функции CRISPR-Cas систем DR применялись и применяются в настоящее время при генотипировании (сполиготикировании) микобактерий [7, 8].

CRISPR-Cas системы очень разнообразны, при этом каждая функциональная кассета обязательно содержит три следующих элемента: повторы, спейсеры и лидерную последовательность. Рядом с кассетой располагается локус из *cas*-генов, кодирующих белки с различными функциональными доменами, взаимодействующими с нуклеиновыми кислотами [9]. Разные наборы *cas*-генов определяют особенности молекулярного механизма CRISPR-Cas систем, но все же в них можно выделить общие черты. Так, два белка, Cas1 и Cas2, обнаружены в большинстве известных на сегодняшний день активных CRISPR-Cas системах. Эти белки образуют комплекс, который участвует в процессе интеграции новых спейсеров в кассету. Новые спейсеры встраиваются в кассету рядом с лидерной последовательностью. В течение жизни кассеты часть спейсеров может быть утеряна в результате рекомбинации между повторами кассеты [10]. Часть кассеты или даже вся кассета целиком может быть перемещена посредством горизонтального переноса генов (ГПГ) [11].

CRISPR-Cas системы классифицируются по составу *cas*-локусов; так, согласно современной классификации, они делятся на 2 больших класса, 5 типов и множество подтипов [12]. К 1 классу (типы I, III и IV) относят системы CRISPR-Cas, обладающие мультисубъединичными эффекторными комплексами, в то время как в системах класса 2 (типы II и V) все функции эффекторного комплекса выполняются одним белком, таким как Cas9 [12]. Учитывая исключительную важность CRISPR-Cas систем типа II в биотехнологии, в том числе для геномного редактирования, стоит отметить, что они довольно редко встречаются и были обнаружены исключительно в геномах бактерий [12]. Большинство CRISPR-Cas систем можно однозначно отнести к одному из пяти основных типов. Тем не менее, существует ряд организмов, *cas*-локусы которых не вписываются в текущую классификацию.

Описывая CRISPR-Cas системы, стоит сделать акцент на генах *cas1* и *cas2*, задействованных в процессе интеграции новых спейсеров. Несмотря на различные доказательства участия обоих генов в процессе интеграции, все ферментативные активности, необходимые для вставки нового спейсера, присущи Cas1, тогда как каталитическая активность Cas2 не

требуется ни для образования комплекса Cas1–Cas2, ни для вставки нового спейсера. На сегодняшний день известно, что белок Cas2 представляет собой интерфазу мПНК, которая специфически расщепляет связанные с рибосомой мПНК — такая активность кажется, на первый взгляд, неуместной при интеграции новых спейсеров. Однако в ряде работ упоминается о возможном происхождении Cas2 от древних мобильных элементов, в частности от систем токсин–антитоксин (ТА) [13, 14]. В связи с этим, можно предположить, что Cas2 сохраняет предковую токсиноподобную функцию эндонуклеазы в системах CRISPR–Cas, но такая ее активность обратимо контролируется посредством ингибирования при взаимодействии с Cas1 и образовании комплекса Cas1–Cas2. Согласно этой гипотезе, когда системы CRISPR-Cas не могут сдерживать рост вируса, может активироваться Cas2 (возможно, путем деградации Cas1) и останавливать транскрипцию, что, вероятно, приводит клетку к самоубийству либо переводит в состояние покоя. Участие же в интеграции спейсеров для Cas2 может быть связано с регулированием или стабилизацией Cas1 посредством образования комплекса Cas1–Cas2, что одновременно обратимо инактивирует Cas2 [15]. Потенциальное участие Cas2 в процессах перевода бактериальной клетки в персистирующее состояние представляет собой перспективное направление исследований для различных патогенов, в том числе для *M. tuberculosis*.

ФУНКЦИИ СИСТЕМ CRISPR-CAS У БАКТЕРИЙ

Учитывая широкую распространенность и разнообразие систем CRISPR-Cas, нетрудно понять, почему с каждым днем публикуется все больше доказательств участия этих систем в различных клеточных процессах [6]. Помимо участия CRISPR-Cas систем в адаптивном иммунитете, наиболее известной и описанной функцией данных систем является регуляция экспрессии генов. Так, у присутствующей в почве бактерии *Mycosoccus xanthus* жизненный цикл включает в себя стадии формирования плодового тела и споруляции. Процессы формирования плодового тела и последующая дифференциация его клеток в микроспоры жестко регулируются различными межклеточными сигналами и внутриклеточными сигнальными каскадами, в которых CRISPR-Cas системы типа I-C *M. xanthus* входят в состав петли положительной обратной связи и принимают участие в споруляции бактерии [16].

На сегодняшний день существуют также доказательства того, что системы CRISPR-Cas могут принимать участие в процессах репарации ДНК. Обнаружено, что очищенный белок Cas1 (YgbT) из *Escherichia coli* способен физически и генетически взаимодействовать с ключевыми компонентами систем репарации ДНК, включая такие гены, как *recB*, *recC* и *ruvB* [17]. Авторы статьи показали, что штамм, у которого произошла делеция *ugbT*, демонстрирует повышенную чувствительность к повреждению ДНК. Аналогичные фенотипы авторы наблюдали и у штаммов с удаленным CRISPR-кластером; это свидетельствует по меньшей мере о том, что некоторые компоненты CRISPR-Cas систем вовлечены в процессы репарации ДНК.

¹ От англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats — короткие полидромные повторы, регулярно расположенные группами.

² От англ. CRISPR-associated proteins.

Была описана еще одна альтернативная функция систем CRISPR-Cas — участие в формировании биопленок [18]. Авторы исследовали CRISPR-Cas систему 1-F оппортунистического патогена *Pseudomonas aeruginosa* и показали, что данная система ингибирует образование биопленки. Описанная авторами CRISPR-зависимая способность образования биопленки зависела от взаимодействия конкретного спейсера с его прототипом — протоспейсером, расположенным в геноме бактериофага. Результат данного взаимодействия в итоге приводил к индукции генов, связанных с фагом, индуцирующих в свою очередь гибель поверхностных клеток. Эти данные свидетельствуют о наличии еще одного механизма, присущего системам CRISPR-Cas и не связанного с адаптивным иммунитетом.

У бактерий контроль экспрессии генов обычно происходит на посттранскрипционном уровне различными малыми некодирующими РНК. И хотя описываемые РНК контролируют многие физиологические процессы в клетках, мало кто из них участвует в распознавании интрузивных нуклеиновых кислот — такую роль берут на себя системы CRISPR-Cas. В отличие от различных систем эукариот, бактериальные системы CRISPR-Cas расщепляют ДНК, а это означает, что если они будут участвовать в регуляции эндогенных генов, то неизбежно разрушат бактериальную хромосому. Однако в 2013 г. в *Nature* была опубликована статья, в которой авторы сообщили о механизме посттранскрипционного контроля у *Francisella novicida*, при котором ген вирулентности регулируется белком Cas (а именно Cas9) и CRISPR-ассоциированными малыми РНК [19]. Предполагается, что в этом случае Cas9 действует на эндогенную мРНК, а не на ДНК. В настоящий момент взаимосвязь между CRISPR-Cas системами и способностью бактериальных штаммов проявлять повышенную вирулентность или даже резистентность к лекарственным средствам представлена в ряде исследований [20].

Говоря о «новых» функциях CRISPR-Cas систем, некоторые авторы считают, что такие функции, как формирование биопленок у *Pseudomonas aeruginosa*, являются «побочными продуктами» классической иммунной функции CRISPR-Cas, тогда как другие, например вирулентность у *Francisella novicida* и регуляция развития у *Mycococcus xanthus*, являются отдельными, самостоятельными функциями [6]. История последовательного открытия различных функций, присущих системам CRISPR-Cas, начиная с иммунной, очень сходна с историей исследования РНК-интерференции эукариот, для которой тоже первоначально было описано

участие в иммунитете, и только потом обнаружено, что РНК-интерференция влияет на многие клеточные процессы, в том числе на регуляцию генов и образование гетерохроматина [21]. Ряд авторов проводят параллель между CRISPR-Cas системами и РНК-интерференцией [22, 23].

CRISPR-CAS СИСТЕМЫ У МИКОБАКТЕРИЙ: ОБЩИЙ ПЛАН СТРОЕНИЯ И ОСОБЕННОСТИ CAS-ОПЕРОНА НА ПРИМЕРЕ *M. TUBERCULOSIS* H37RV

Род *Mycobacterium* представлен широким спектром микроорганизмов, включая патогенные для человека, из которых наиболее значимы микобактерии туберкулезного комплекса (МТК). Среди прочих этот комплекс включает в себя *Mycobacterium tuberculosis* — основного возбудителя туберкулеза. *M. tuberculosis* генетически гетерогенен и делится на несколько групп, так называемых линий, для каждой из которых характерен определенный набор мутаций, постепенно накапливавшихся в ходе эволюции [24–26]. Изоляты из разных линий различаются фенотипически, в том числе по тенденции к развитию лекарственной устойчивости (ЛУ), уровню вирулентности и патогенности, что влияет на тяжесть течения заболевания [27, 28]. К числу наиболее распространенных и клинически значимых в мире линий *M. tuberculosis* принадлежат Beijing, Haarlem, LAM, S. Линия Beijing (в особенности недавно сформировавшаяся в ее составе сублиния B0/W-148) является наиболее эпидемиологически значимой в связи с широким распространением и склонностью к формированию ЛУ-форм [29, 30]. Для линии Haarlem также характерен повышенный уровень вирулентности [28]. Помимо этого, определенный интерес вызывают представители линий EAI и Ural, обладающие, наоборот, сниженной вирулентностью, и в связи с этим менее распространенные [28]. EAI — это древняя линия, имеющая ограниченное распространение на сегодняшний день (преимущественно Юго-Восточная Азия) [31]. Линия Ural, родственная Haarlem, как и EAI не особенно широко распространена и, по-видимому, обладает сниженной трансмиссивностью [32] (рис. 1).

Если учитывать потенциальную роль CRISPR-Cas в вирулентности [19, 20], представляется интересным изучение этой системы у различных линий *M. tuberculosis*.

На сегодняшний день системы CRISPR-Cas обнаружены у 14 видов микобактерий [34]. Все обнаруженные системы CRISPR-Cas располагаются на хромосоме. CRISPR-кассеты с числом повторов более 5 идентифицированы только у трех микобактериальных видов: *M. tuberculosis* и

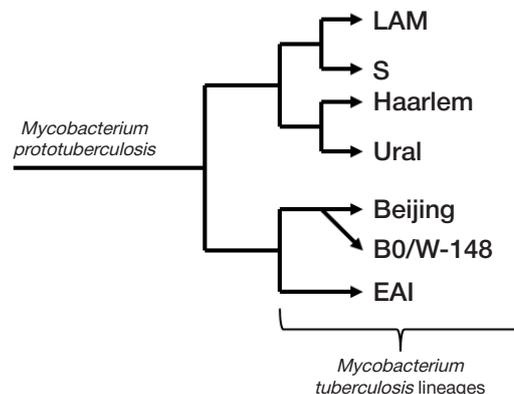


Рис. 1. Схематическое представление филогении рассматриваемых линий *M. tuberculosis* [33]

M. bovis, относящихся к МТК, и у патогена *M. avium*. При этом у *M. avium* рядом с CRISPR-кассетой отсутствуют *cas*-гены; а структуры CRISPR-локусов *M. tuberculosis* и *M. bovis* очень похожи — это отражает тесную эволюционную взаимосвязь между ними и согласуется с их филогенией [34, 35]. Для систем CRISPR-Cas *M. tuberculosis* характерно строение, типичное для систем типа III-A [34].

Были проанализированы CRISPR-Cas системы из 41 полногеномной последовательности штаммов из различных линий *M. tuberculosis*, доступных в базе данных RefSeq NCBI: 13 геномов линии Beijing; 3 генома линии B0/W-148; 2 генома линии EAI; 10 геномов линии Haarlem; 1 геном линии Ural; 2 генома линии S; 10 геномов линии LAM. Дополнительно были проанализированы 7 геномов сублинии B0/W-148, 4 генома линии URAL, 3 генома линии EAI и 3 генома линии S в статусе «draft», что было связано с недостаточным количеством «complete»-геномов для данных линий. Генотипирование осуществляли по маркерным полиморфизмам [36–38]. Для ряда геномов генотип изолята был заранее известен из литературных источников. Поиск и анализ CRISPR-Cas систем проводили с помощью двух алгоритмов: CRISPRFinder и CRISPR Recognition Tool [39, 40]. На рис. 2 представлено типичное строение системы CRISPR-Cas у *M. tuberculosis* на примере штамма H37Rv, являющегося общепринятым референсным геномом.

Большинство проанализированных штаммов *M. tuberculosis* содержат две длинные CRISPR-касеты (см. рис. 2) [8]. Исключением является штамм *M. tuberculosis* 7199–99, относящийся к линии Haarlem, у которого произошла редукция кассеты CRISPR2 с 12-го спейсера и разделяющего кассеты участка, что привело к формированию единой кассеты, содержащей 33 спейсера. Максимальное количество спейсеров в одном геноме — 57 [8], наименьшее количество — 10 (часть штаммов сублинии B0/W-148). Рядом с кассетой CRISPR1 расположено 9 *cas*-генов: *cas2*, *cas1*, *cas6*, *cas5*, *cas4*, *cas3*, *cas2*, *cas10* (*cas1*) и *cas6* (см. рис. 2). Отличительной особенностью *cas*-генов у *M. tuberculosis* является их высокая консервативность. Среди проанализированных геномов не были обнаружены мутации в генах *cas1*, *cas2*, *cas4*, *cas2* и *cas6*. Мутации в других генах единичны и

носили случайный характер (табл. 1). Кассета CRISPR2 отделена от первой кассеты участком длиной около ~ 1300 п.н. (см. рис. 2). В данном промежутке аннотированы две транспозазы принадлежащие к семейству IS6110 [34]. Стоит также отметить, что для систем CRISPR-Cas *M. tuberculosis* характерна короткая лидерная последовательность из 48 п.н. [34].

ОСОБЕННОСТИ CRISPR-CAS СИСТЕМ У РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ В СОСТАВЕ *M. TUBERCULOSIS*

Линия Beijing

Для изолятов линии Beijing характерна делеция региона, содержащего гены *cas1*, *cas2*, *cas5*, *cas6* (см. табл. 1) и кассету CRISPR1 [8, 34]. Оставшаяся кассета CRISPR2 содержит не 18, а 14 спейсеров, 10 из которых (Sp1-Sp10) являются общими для всех линий *M. tuberculosis*, а 4 спейсера (SpB11-SpB14, где B обозначает Beijing) специфичны для рассматриваемой линии (рис. 3). Эти спейсеры не встречаются у представителей других линий *M. tuberculosis*.

Следует отметить, что в промежутке между геном *cas4* и кассетой CRISPR2 у большинства штаммов аннотировано две транспозазы. А сам ген *cas4* заметно короче своего ортолога из других линий — длина кодируемого им белка составляет либо 76 а. о., либо 116–118 а. о., тогда как в штаммах из других линий *M. tuberculosis* — 302 а. о. При длине около 100 а. о. в данном белке не сохраняются консервативные домены, необходимые для его взаимодействия с геном *cas3* (внутри комплекса *cas1-cas4-cas3*) [41]. В связи с этим в линии Beijing, возможно, нарушена стадия интерференции.

Линия Beijing начала формироваться в Северном Китае, Корее и Японии около 7000 лет назад [37] (рис. 4). По всей вероятности, после отделения данной линии формирование кассеты CRISPR2 продолжалось с участием специфичных для неё спейсеров (SpB11-SpB14), что могло быть вызвано отличиями в факторах окружающей среды, с которыми встречался патоген. Далее в линии Beijing произошла потеря нескольких *cas*-генов, в том числе *cas1* и *cas2*, участвующих в интеграции новых спейсеров, и формирование кассеты прекратилось. Таким образом,

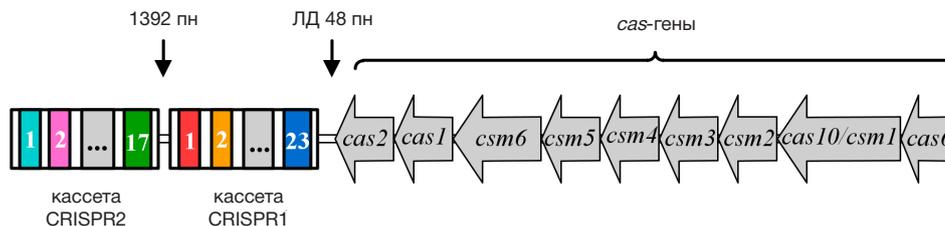


Рис. 2. Общая схема строения системы CRISPR-Cas *M. tuberculosis* на примере штамма H37Rv. ЛД — лидерная последовательность

Таблица 1. Сравнительный анализ *cas*-генов из шести линий (и одной сублинии) *M. tuberculosis*

Линия \ Ген	<i>cas2</i>	<i>cas1</i>	<i>cas6</i>	<i>cas5</i>	<i>cas4</i>	<i>cas3</i>	<i>cas2</i>	<i>cas10</i>	<i>cas6</i>
Beijing и B0/W-148	гены отсутствуют				100%	99%	100%	99%	100%
EAI	100%*	100%	100%	100%					
Haarlem			100%	100%					
Ural			99%	99%					
S			99%	99%					
LAM			99%	99%					

Примечание: * — представлены проценты идентичности, рассчитанные по программе BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

для всей линии характерно наличие единственной кассеты CRISPR2, включающей в себя 14 спейсеров. Однако у ряда изолятов в составе молодой в эволюционном отношении сублинии B0/W-148, входящей в состав линии Beijing, обнаружена утрата нескольких спейсеров. У одной части этих изолятов отсутствуют спейсеры SpB13 и SpB14, а у другой части нет всех 4 спейсеров (SpB11-SpB14), специфичных для линии Beijing. Стоит отметить, что спейсеры SpB11-SpB14 были также обнаружены нами в составе кассеты у некоторых штаммов *M. bovis*.

Высокая частота возникновения мутаций и снижение репарации ДНК, описанные в литературе у линии Beijing [42], возможно связанные с редукцией CRISPR-Cas системы, потенциально могут служить причиной изменчивости линии и приводить к возникновению ЛУ. Предположение, что редуцированные или отсутствующие CRISPR-Cas системы связаны с ЛУ, соответствует результатам, полученным в недавно проведенном исследовании патогенной бактерии *Campylobacter jejuni*, в котором штаммы, вызывающие наиболее тяжелые гастроэнтериты и постинфекционные осложнения, также имели укороченные CRISPR-кассеты или полностью были лишены CRISPR-Cas систем [20, 43].

Линии Ural и Haarlem

Для линий Ural и Haarlem характерны инсерции спейсеров. Они происходят в кассете CRISPR1 после Sp3. Наличие вставки характерно только для части проанализированных изолятов Haarlem и всех изолятов линии Ural. Стоит отметить, что данные спейсеры встречаются среди некоторых изолятов *M. bovis*, а также у двух изолятов линии EAI, в связи с чем нельзя исключать наличие событий рекомбинации и горизонтального переноса генов (ГПГ).

Нами были также зафиксированы единичные случаи потери и приобретения спейсеров в кассете CRISPR2 у линий Ural и Haarlem. Так, у 3 изолятов линии Ural наблюдается потеря спейсеров Sp4-Sp6 в кассете CRISPR2, а у 2 изолятов линии Haarlem — потеря спейсера Sp6 из второй кассеты.

Линия EAI

Для линии EAI характерны наиболее протяженные CRISPR-кассеты среди всех линий *M. tuberculosis*. Возможно, это отчасти связано с тем, что линия EAI одна из наиболее

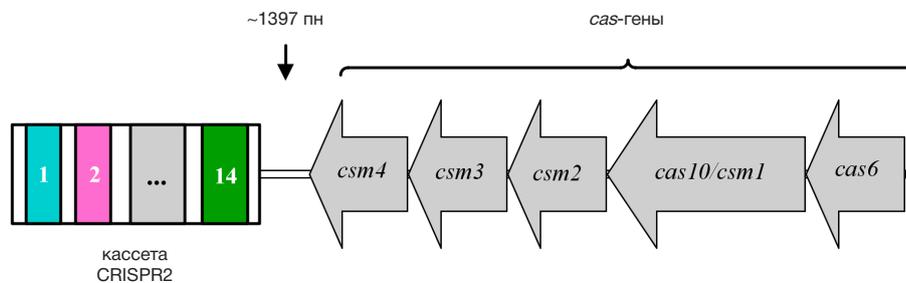


Рис. 3. Строение системы CRISPR-Cas линии Beijing *M. tuberculosis*. Десять высококонсервативных спейсеров, общих для всех линий *M. tuberculosis*, располагаются на дистальном по отношению к лидерной последовательности конце кассеты CRISPR2 и являются предковыми спейсерами, соответствующими более древнему состоянию CRISPR-иммунитета [10]. «Новые» спейсеры, приобретенные недавно, как уже было сказано выше, располагаются рядом с лидерной последовательностью

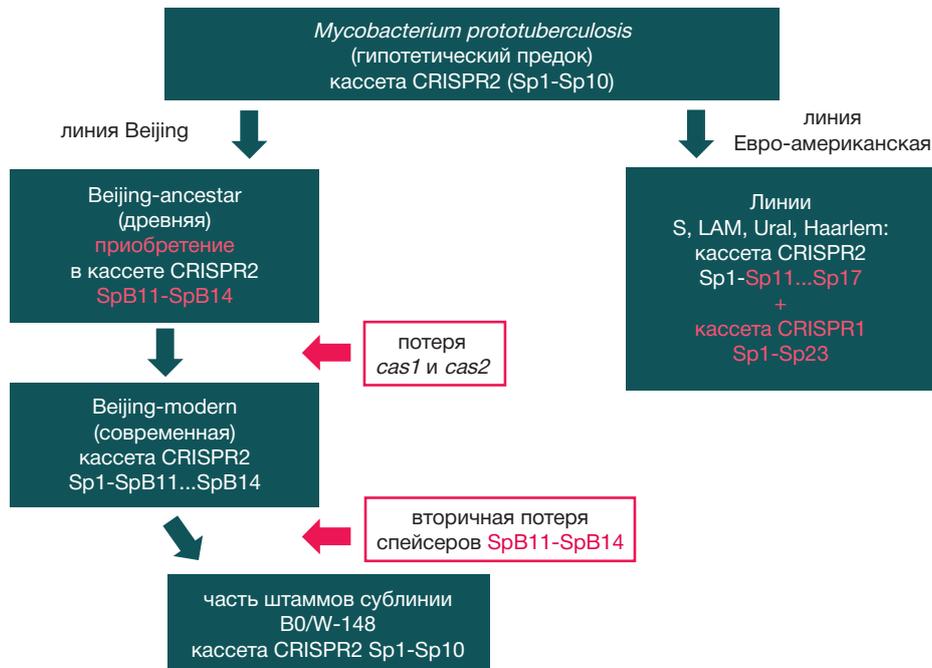


Рис. 4. Эволюция CRISPR-кассеты у линии Beijing *M. tuberculosis*. После формирования первых 10 спейсеров кассеты CRISPR2 (наиболее древних) произошло расхождение Евро-американской линии к линии Beijing. Спейсеры SpB11-SpB14 линии Beijing не тождественны Sp11-Sp14 из других линий *M. tuberculosis*. В связи с утратой генов *cas1* и *cas2*, участвующих в интеграции новых спейсеров, рост кассеты CRISPR2 в линии Beijing, по-видимому, остановился. Строение системы CRISPR-Cas у линии Beijing оставалось неизменным на протяжении достаточно долгого периода, но у наиболее молодой сублинии (B0/W-148) мы наблюдаем потерю четырех спейсеров (SpB11-SpB14), приобретенных самыми последними

древних. В ряде случаев длина кассеты CRISPR2 превышает 24 спейсера, а длина кассеты CRISPR1 — 30. Наибольшее количество спейсеров нами было обнаружено у изолята HN-024: 25 спейсеров для кассеты CRISPR1 и 34 спейсера для кассеты CRISPR2, среди которых присутствует ряд уникальных для этой линии спейсеров.

Линии S и LAM

Для линий S и LAM в общем характерно каноническое для *M. tuberculosis* строение CRISPR-Cas системы (см. рис. 2). В этих линиях может наблюдаться некоторый полиморфизм, например, у двух изолятов линии LAM в одном случае встречается потеря спейсеров Sp4-Sp6 кассеты CRISPR1, а в другом случае — потеря спейсера Sp20 из этой же кассеты.

В общем, описывая особенности кассет систем CRISPR-Cas *M. tuberculosis*, можно сказать, что кассета CRISPR1 отличается значительной вариабельностью, что и позволяет использовать ее для генотипирования [8]. Несмотря на то, что делеция спейсеров довольно распространена, среди десяти дистальных спейсеров Sp1-Sp10 кассеты CRISPR2 (по отношению к лидерной последовательности), являющихся предковыми и отличающихся высокой консервативностью, она практически не наблюдается, так же, как и мутации. Протоспейсеры для них до сих пор не установлены. Кроме того, хотя древние спейсеры и оцениваются часто как малозначимые по причине высокой изменчивости и быстрой эволюции профагов, защиту от которых они обеспечивали, они сохраняются неизменными у всех рассмотренных нами линий *M. tuberculosis*, не подвергаясь делеции. Поэтому возможно и другое объяснение: данные спейсеры могут иметь большое значение для жизнедеятельности бактерии, и их роль еще только предстоит узнать.

ПОИСК ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПАРТНЕРОВ И КОМПЕНСАТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРИ РЕДУКЦИИ ЧАСТИ СИСТЕМЫ CRISPR-CAS У ЛИНИИ BEIJING

Поиск возможных функциональных партнеров и механизмов компенсации функций генов *cas1*, *cas2*, *csm5*, *csm6* у представителей линии Beijing осуществляли с помощью метода филогенетического профайлинга генов в последовательностях геномов штаммов различных линий *M. tuberculosis* (анализировали 130

полногеномных последовательностей, доступных в NCBI). Филогенетический профиль (ФП) представляет собой бинарный вектор, определяющий наличие кодирующей последовательности изучаемого белка в геномах группы организмов [44]. Предполагается, что эволюция генов, принадлежащих к одному функциональному пути, происходит совместно, поэтому гены, характеризующиеся сходными или инвертированными ФП, могут выступать в качестве кандидатов на роль функциональных партнеров или компенсаторных механизмов соответственно.

Филогенетический профайлинг включал в себя определение групп ортологов в геномах штаммов различных линий *M. tuberculosis*, построение бинарных векторов, построение матрицы попарных расстояний между векторами и кластеризацию ФП. Построение и визуализацию ФП генов проводили с использованием программ OrthoFinder v.2.0.0 [45] и Count [46]. Матрицу попарных расстояний между ФП получали с использованием значений взаимной информации (MI): $D_{MI} = 1 - MI$. Кластерный анализ проводили с помощью метода невзвешенного попарного среднего (UPGMA) [47].

Оценка результатов кластерного анализа ФП позволила установить гены, характеризующиеся сходным характером эволюционных событий по отношению к анализируемым геном *cas1*, *cas2*, *csm5*, *csm6* (рис. 5, А). Потеря части системы CRISPR-Cas у ряда изолятов *M. tuberculosis* (принадлежащих линии Beijing) сопровождалась, по видимому, по крайней мере двумя эволюционными событиями потери и событием приобретения участков генома (в разных участках хромосомы) (рис. 5, Б, В).

В первом случае, в результате анализа ФП в геномах линии Beijing *M. tuberculosis* были обнаружены специфичные для линии протяженные делеции. В результате данных событий ортологи генов Rv0071, Rv0072, Rv0073 и Rv1761c, Rv1760, Rv1758 (идентификаторы соответствуют генам в геноме *M. tuberculosis* H37Rv) (табл. 2) приобрели схожие ФП (профили партнеров, см. рис. 5, Б). Стоит отметить, что хромосомный регион, содержащий гены Rv1761c, Rv1760 и Rv1758, фланкирован инвертированными повторами IS-элементов *IS6110*, относящихся к семейству IS3. Во втором случае, в результате анализа ФП в геномах линии Beijing *M. tuberculosis* была обнаружена специфичная для линии протяженная инсерция, и в результате этих событий ортологи генов CFBS_RS10335, CFBS_RS10345, CFBS_RS10350, CFBS_RS10355, CFBS_RS10360, CFBS_RS10365, CFBS_RS21395 (идентификаторы соответствуют

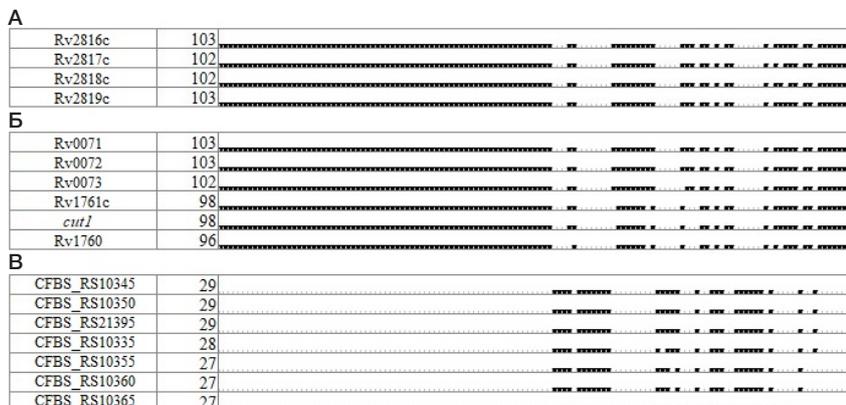


Рис. 5. Филогенетические профили генов в последовательностях геномов штаммов различных линий *M. tuberculosis*. В каждой строчке последовательно указаны идентификатор гена, количество геномов, содержащих ортолог, а также ФП гена, где пробелы соответствуют отсутствию гена в геноме. А. ФП *cas*-генов *M. tuberculosis* H37Rv: *cas2* (Rv2816c), *cas1* (Rv2817c), *csm6* (Rv2818c), *csm5* (Rv2819c). Б. ФП предполагаемых функциональных партнеров *cas*-генов *M. tuberculosis* в геноме штамма H37Rv. В. ФП генов, предположительно участвующих в формировании компенсаторных механизмов в геноме штамма CDC5079 (линия Beijing) в результате утраты части системы CRISPR-Cas

Таблица 2. Характеристика генов — возможных функциональных партнеров и генов, участвующих в компенсаторных механизмах для систем CRISPR-Cas*

Эволюционное событие	Идентификатор гена	Продукт (белок)	Функция белка
Инсерция	CFBS_RS10360 (<i>tuf</i>)	Железорегулируемый фактор элонгации трансляции Tu Tuf	Принимает участие в трансляции белка
	CFBS_RS10365	MDR-дегидрогеназа	Для группы MDR-дегидрогеназ характерны различные виды активности, включая основную алкогольдегидрогеназную, хинонредуктазную, сорбитолдегидрогеназную, формальдегиддегидрогеназную, кеторедуктазную и другие
Делеция	Rv1758 (<i>cut1</i>)	Кутиназа	Фермент, катализирующий гидролиз кутина [48]
	Rv1760	Диацилглицеролацетилтрансфераза	Катализирует заключительные стадии биосинтеза триацилглицерина и других компонентов клеточной стенки микобактерий [49]
	Rv0072	Глутамин ABC-транспортер пермеаза	ABC-транспортер, участие в транспорте глутамина (пермеаза); вероятно, отвечает за транслокацию субстрата через мембрану [50]
	Rv0073	Глутамин ABC-транспортер АТФ-связывающий белок	ABC-транспортер, участие в транспорте глутамина (связывающий протеин); вероятно, отвечает за энергетическую связь с транспортной системой [50]

Примечание: * — в таблице описаны только аннотированные гены; оставшиеся гены кодируют гипотетические белки с неизвестными функциями (Rv1761с и CFBS_RS10335, CFBS_RS10345, CFBS_RS10350, CFBS_RS10355, CFBS_RS21395) либо, в случае Rv0071, представляют собой мобильный самосплайсирующий ретроэлемент, так называемый интрон группы II.

генам в геноме *M. tuberculosis* CCDC5079) (см. табл. 2) приобрели близкие к инвертированным ФП (профили компенсаторов, см. рис. 5, В).

Таким образом, в ходе анализа ФП были обнаружены гены со сходным характером эволюционных событий: было установлено, что потеря генов *cas1*, *cas2*, *cas5*, *cas6* у представителей линии Beijing *M. tuberculosis* сопровождалась событиями потери и приобретения ряда других генов (см. табл. 2). Данные гены-кандидаты потенциально способны участвовать в механизмах компенсации функций *cas*-генов или являться функциональными партнерами *cas*-генов у *M. tuberculosis*, что служит предметом дальнейших экспериментальных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У *M. tuberculosis* наблюдается значительная вариативность систем CRISPR-Cas, от протяженных кассет, характерных для линии EAI, до частично редуцированных систем CRISPR-Cas у линии Beijing. Таким образом, наличие активной системы CRISPR-Cas типа III-A не является обязательным условием для эволюционного успеха (в отношении патогенности, вирулентности, трансмиссивности и адаптируемости) линии.

Утрата части кассеты и ряда *cas*-генов представителями линии Beijing *M. tuberculosis* привела, по-видимому, к полной или частичной потере способности их систем CRISPR-Cas разрушать чужеродную ДНК. Нарушение функционирования системы CRISPR-Cas у одной из наиболее успешных линий *M. tuberculosis* могло сопровождаться механизмами компенсации утраченных генов (например, в результате проведенного анализа была обнаружена специфичная для линии Beijing протяженная инсерция); а также утратой функциональных партнеров *cas*-генов, так как в общем случае предполагается, что ген, утративший своего функционального партнера, не будет сохраняться в геноме в результате отбора и подлжет элиминации, как подтверждение этому — обнаруженные специфичные для линии Beijing протяженные делеции. Следует отметить, что обнаруженные в ходе анализа закономерности в характере эволюционных событий потери и приобретения генов могут носить случайный

характер и подлежат экспериментальной верификации. Филогенетический профайлинг позволяет выдвинуть гипотезы и предоставляет необходимый для дальнейшего изучения материал.

Несмотря на то, что система CRISPR-Cas у представителей линии Beijing *M. tuberculosis* может быть неактивна, предполагается, что в случае линий, у которых присутствуют полный набор *cas*-генов и повторы, система сохраняет активность и способна участвовать в защите от чужеродной ДНК [34]. Учитывая короткую лидерную последовательность, характерную для всех систем CRISPR-Cas *M. tuberculosis*, возможно, при изучении этих систем у данного организма стоит отдать предпочтение исследованию их альтернативных функций, таких как регуляция экспрессии генов, репарация ДНК, формирование вирулентности и других.

Строение CRISPR-Cas системы *M. tuberculosis* изучено и описано достаточно подробно [8], а роль этих систем остается неизвестной. Для большинства микобактериальных спейсеров до настоящего времени не удалось найти протоспейсеры среди известных микобактериофагов. Это может быть связано с тем, что большая часть бактериофагов *M. tuberculosis* была выделена с использованием в качестве хозяина *M. smegmatis* с последующей проверкой способности поражать *M. tuberculosis* [34]. Разница в наборе спейсеров, наблюдаемая у различных линий, может привести к потенциальному различию в реализации бактериального иммунитета и, как следствие, к различной устойчивости к фагам, а также разнице в регуляции экспрессии. Помимо спейсеров интерес вызывает изучение роли белка Cas2 вне комплекса Cas1-Cas2, в связи с выдвинутой ранее гипотезой [15], что при «самостоятельной» активации данный белок способен прекращать трансляцию, и, вероятно, тем самым переводить клетку в состояние покоя, либо провоцировать апоптоз. Также представляет интерес поиск ингибиторов для Cas2. Особое внимание стоит обратить на возможную функциональную связь между системами CRISPR-Cas, в частности *cas*-генами, и TA-системами [38]. Возможное участие систем CRISPR-Cas в вирулентности и устойчивости к лекарственным препаратам позволит разработать новые подходы в борьбе с лекарственно-устойчивыми штаммами *M. tuberculosis*.

Литература

- Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet.* 2010; 11 (3): 181–190.
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics.* 2007; 8: 172. doi:10.1186/1471-2105-8-172.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987; 169 (12): 5429–33.
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 2005; 151 (8): 2551–61.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007; 315: 1709–1712.
- Westra ER, Buckling A, Fineran PC. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat Rev Microbiol.* 2014; 12 (5): 317–326. DOI: 10.1038/nrmicro3241.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology.* 1997; 35 (4): 907–14.
- van Embden JD, van Gorkom T, Kremer K, Jansen R, van Der Zeijst BA, Schouls LM. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J Bacteriol.* 2000 May; 182 (9): 2393–401.
- Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol.* 2005; 1 (6): e60.
- Gogleva AA, Gelfand MS, Artamonova II. Comparative analysis of CRISPR cassettes from the human gut metagenomic contigs. *BMC Genomics.* 2014; 15 (1): 202. DOI:10.1186/1471-2164-15-202.
- Takeuchi N, Wolf YI, Makarova KS, Koonin EV. Nature and Intensity of Selection Pressure on CRISPR-Associated Genes. *J Bacteriol.* 2012; 194 (5): 1216–25.
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature reviews Microbiology.* 2015; 13 (11): 722–36. DOI:10.1038/nrmicro3569.
- Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas Systems. *Cell.* 2017; 168 (5): 946–46.
- Goeders N, van Melderen L. Toxin-Antitoxin Systems as Multilevel Interaction Systems. *Toxins.* 2014; 6 (1): 304–24.
- Makarova KS, Anantharaman V, Aravind L, Koonin EV. Live virus-free or die: coupling of antiviral immunity and programmed suicide or dormancy in prokaryotes. *Biol Direct.* 2012; 7: 40.
- Viswanathan P, Murphy K, Julien B, Garza AG, Kroos L. Regulation of dev, an Operon That Includes Genes Essential for *Myxococcus xanthus* Development and CRISPR-Associated Genes and Repeats. *J Bacteriol.* 2007; 189 (10): 3738–50.
- Babu M, Beloglazova N, Flick R, Graham C, Skarina T, Nocek B, et al. A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Mol Microbiol.* 2011; 79 (2): 484–502.
- Heussler GE, Cady KC, Koeppen K, Bhuju S, Stanton BA, O'Toole GA. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-Dependent, Biofilm-Specific Death of *Pseudomonas aeruginosa* Mediated by Increased Expression of Phage-Related Genes. *mBio.* 2015; 6 (3): e00129-15.
- Sampson TR, Saroj SD, Llewellyn AC, Tzeng Y-L, Weiss DS. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature.* 2013; 497: 254–7.
- Louwen R, Horst-Krefit D, de Boer AG, van der Graaf L, de Knecht G, Hamersma M, et al. A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain-Barré syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32 (2): 207–26.
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature.* 2012; 482, 331–38.
- Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet.* 2011; 45: 273–97.
- Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct.* 2006; 1: 7.
- Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7 (5): 328–37.
- Прозоров А. А., Даниленко В. Н. Микобактерии туберкулезного комплекса: геномика, молекулярная эпидемиология, пути эволюции. *Успехи современной биологии.* 2011; 131 (3): 227–43.
- Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur PK, Bielecki J. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other *Mycobacteria*. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:645802.
- Прозоров А. А., Федорова И. А., Беккер О. Б., Даниленко В. Н. Факторы вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*: генетический контроль, новые концепции. *Генетика.* 2014; 50 (8): 885–908.
- Reiling N, Homolka S, Walter K, Brandenburg J, Niwinski L, Ernst M et al. Clade specific virulence patterns of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains in human primary macrophages and aerogenically infected mice. *MBio.* 2013; 4 (4): pii: e00250-13.
- Lasunskaja E, Ribeiro SC, Manicheva O, Gomes LL, Suffys PN, Mokrousov I, et al. Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes Infect.* 2010; 12 (6): 467–75.
- Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis (Edinb).* 2011; 91 (6): 510–23.
- Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K, et al. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog.* 2008; 4 (9): e1000160.
- Mokrousov I. The quiet and controversial: Ural family of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol.* 2012; 12 (4): 619–29.
- Mikhecheva NE, Zaychikova MV, Melerzanov AV, Danilenko VN. A nonsynonymous SNP catalog of *Mycobacterium tuberculosis* virulence genes and its use for detecting new potentially virulent sublineages. *Genome Biol Evol.* 2017; 9 (4): 887–99.
- He L, Fan X, Xie J. Comparative genomic structures of *Mycobacterium* CRISPR-Cas. *J Cell Biochem.* 2012; 113 (7): 2464–73.
- Brosch R, Pym AS, Gordon SV, Cole ST. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol.* 2001; 9 (9): 452–58.
- Homolka S, Projahn M, Feuerriegel S, Ubben T, Diel R, Nübel U et al. High resolution discrimination of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex strains based on single nucleotide polymorphisms. *PLoS One.* 2012; 7 (7): e39855.
- Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Frebourg N, Lecher S, Willery E, et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet.* 2015; 47 (3): 242–49.
- Zaychikova MV, Zakharevich NV, Sagaidak MO, Bogolubova NA, Smirnova TG, Andreevskaya SN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic Polymorphisms and Functional Properties and the Possibility of Their Use for Genotyping. *PLoS One.* 2015; 10: e0143682.
- Bland C, Ramsey TL, Sabree F, Lowe M, Brown K, Kyrpidis NC,

- et al. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. *BMC Bioinformatics*. 2007; 8: 209.
40. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35: 52–7.
 41. Numata T, Inanaga H, Sato C, Osawa T. Crystal structure of the Csm3-Csm4 subcomplex in the type III-A CRISPR-Cas interference complex. *J Mol Biol*. 2015; 427 (2): 259–73.
 42. Mestre O, Luo T, Dos Vultos T, Kremer K, Murray A, Namouchi A, et al. Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains constructed from polymorphisms in genes involved in DNA replication, recombination and repair. *PLoS One*. 2011; 6 (1): e16020.
 43. Freidlin PJ, Nissan I, Luria A, Goldblatt D, Schaffer L, Kaidar-Shwartz H, et al. Structure and variation of CRISPR and CRISPR-flanking regions in deleted-direct repeat region *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *BMC Genomics*. 2017; 18 (1): 168.
 44. Pellegrini M, Marcotte EM, Thompson MJ, Eisenberg D, Yeates TO. Assigning protein functions by comparative genome analysis: protein phylogenetic profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96 (8): 4285–8.
 45. Emms DM, Kelly S. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome Biology*. 2015; 16: 157.
 46. Count CM.: evolutionary analysis of phylogenetic profiles with parsimony and likelihood. *Bioinformatics*. 2010; 26 (15): 1910–2.
 47. Sokal R, Michener C. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*. 1958; 38: 1409–1438.
 48. Monu, Meena LS. Roles of Triolein and Lipolytic Protein in the Pathogenesis and Survival of *Mycobacterium tuberculosis*: a Novel Therapeutic Approach. *Appl Biochem Biotechnol*. 2016; 178 (7): 1377–89.
 49. Deb C, Lee CM, Dubey VS, Daniel J, Abomoelak B, Sirakova TD, et al. A Novel In Vitro Multiple-Stress Dormancy Model for *Mycobacterium tuberculosis* Generates a Lipid-Loaded, Drug-Tolerant, Dormant Pathogen. *PLoS ONE*. 2009; 4 (6): e6077.
 50. Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev*. 2000; 24 (4): 449–67.

References

1. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet*. 2010; 11 (3): 181–190.
2. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*. 2007; 8: 172. DOI: 10.1186/1471-2105-8-172.
3. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987; 169 (12): 5429–33.
4. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005; 151 (8): 2551–61.
5. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007; 315: 1709–1712.
6. Westra ER, Buckling A, Fineran PC. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2014; 12 (5): 317–326. DOI: 10.1038/nrmicro3241.
7. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997; 35 (4): 907–14.
8. van Embden JD, van Gorkom T, Kremer K, Jansen R, van Der Zeijst BA, Schouls LM. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J Bacteriol*. 2000 May; 182 (9): 2393–401.
9. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*. 2005; 1 (6): e60.
10. Gogleva AA, Gelfand MS, Artamonova II. Comparative analysis of CRISPR cassettes from the human gut metagenomic contigs. *BMC Genomics*. 2014; 15 (1): 202. DOI: 10.1186/1471-2164-15-202.
11. Takeuchi N, Wolf YI, Makarova KS, Koonin EV. Nature and Intensity of Selection Pressure on CRISPR-Associated Genes. *J Bacteriol*. 2012; 194 (5): 1216–25.
12. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature reviews Microbiology*. 2015; 13 (11): 722–36. DOI: 10.1038/nrmicro3569.
13. Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas Systems. *Cell*. 2017; 168 (5): 946–46.
14. Goeders N, van Melder L. Toxin-Antitoxin Systems as Multilevel Interaction Systems. *Toxins*. 2014; 6 (1): 304–24.
15. Makarova KS, Anantharaman V, Aravind L, Koonin EV. Live virus-free or die: coupling of antiviral immunity and programmed suicide or dormancy in prokaryotes. *Biol Direct*. 2012; 7: 40.
16. Viswanathan P, Murphy K, Julien B, Garza AG, Kroos L. Regulation of dev, an Operon That Includes Genes Essential for *Myxococcus xanthus* Development and CRISPR-Associated Genes and Repeats. *Journal of Bacteriology*. 2007; 189 (10): 3738–50.
17. Babu M, Beloglazova N, Flick R, Graham C, Skarina T, Nocek B, et al. A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Mol Microbiol*. 2011; 79 (2): 484–502.
18. Heussler GE, Cady KC, Koeppen K, Bhujju S, Stanton BA, O'Toole GA. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-Dependent, Biofilm-Specific Death of *Pseudomonas aeruginosa* Mediated by Increased Expression of Phage-Related Genes. *mBio*. 2015; 6 (3): e00129-15.
19. Sampson TR, Saroj SD, Llewellyn AC, Tzeng Y-L, Weiss DS. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature*. 2013; 497: 254–257.
20. Louwen R, Horst-Kreft D, de Boer AG, van der Graaf L, de Knecht G, Hamersma M, et al. A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain-Barré syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013; 32 (2): 207–26.
21. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*. 2012; 482, 331–38.
22. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*. 2011; 45: 273–97.
23. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*. 2006; 1: 7.
24. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7 (5): 328–37.
25. Prozorov AA, Danilenko VN. *Mycobacterii tuberculoznogo kompleksa: genomika, molekularnaja epidemiologija, puti evoluzii. Usphehi sovremennoy biologii*. 2011; 1 (6): 483–95.
26. Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur PK, Bielecki J. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other *Mycobacteria*. *Biomed*

- Res Int. 2014; 2014:645802.
27. Prozorov AA, Fedorova IA, Bekker OB, Danilenko VN. Faktory virulentnosti Mycobacterium tuberculosis: geneticheskiy kontrol, novie konceptzii. *Genetika*. 2014; 50 (8): 775–97.
 28. Reiling N, Homolka S, Walter K, Brandenburg J, Niwinski L, Ernst M et al. Clade specific virulence patterns of Mycobacterium tuberculosis complex strains in human primary macrophages and aerogenically infected mice. *MBio*. 2013; 4 (4): pii: e00250-13.
 29. Lasunskaja E, Ribeiro SC, Manicheva O, Gomes LL, Suffys PN, Mokrousov I, et al. Emerging multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes Infect*. 2010; 12 (6): 467–75.
 30. Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011; 91 (6): 510–23.
 31. Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K, et al. Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex. *PLoS Pathog*. 2008; 4 (9): e1000160.
 32. Mokrousov I. The quiet and controversial: Ural family of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Genet Evol*. 2012; 12 (4): 619–29.
 33. Mikheeva NE, Zaychikova MV, Melerzanov AV, Danilenko VN. A nonsynonymous SNP catalog of Mycobacterium tuberculosis virulence genes and its use for detecting new potentially virulent sublineages. *Genome Biol Evol*. 2017; 9 (4): 887–99.
 34. He L, Fan X, Xie J. Comparative genomic structures of Mycobacterium CRISPR-Cas. *J Cell Biochem*. 2012; 113 (7): 2464–73.
 35. Brosch R, Pym AS, Gordon SV, Cole ST. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol*. 2001; 9 (9): 452–58.
 36. Homolka S, Projahn M, Feuerriegel S, Ubben T, Diel R, Nübel U et al. High resolution discrimination of clinical Mycobacterium tuberculosis complex strains based on single nucleotide polymorphisms. *PLoS One*. 2012; 7 (7): e39855.
 37. Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Frebourg N, Lecher S, Willery E, et al. Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage. *Nat Genet*. 2015; 47 (3): 242–49.
 38. Zaychikova MV, Zakharevich NV, Sagaidak MO, Bogolubova NA, Smirnova TG, Andreevskaya SN, et al. Mycobacterium tuberculosis Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic Polymorphisms and Functional Properties and the Possibility of Their Use for Genotyping. *PLoS One*. 2015; 10: e0143682
 39. Bland C, Ramsey TL, Sabree F, Lowe M, Brown K, Kyrpides NC et al. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. *BMC Bioinformatics*. 2007; 8: 209.
 40. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35: 52–57.
 41. Numata T, Inanaga H, Sato C, Osawa T. Crystal structure of the Csm3-Csm4 subcomplex in the type III-A CRISPR-Cas interference complex. *J Mol Biol*. 2015; 427 (2): 259–73.
 42. Mestre O, Luo T, Dos Vultos T, Kremer K, Murray A, Namouchi A, et al. Phylogeny of Mycobacterium tuberculosis Beijing strains constructed from polymorphisms in genes involved in DNA replication, recombination and repair. *PLoS One*. 2011; 6 (1): e16020.
 43. Freidlin PJ, Nissan I, Luria A, Goldblatt D, Schaffer L, Kaidar-Shwartz H, et al. Structure and variation of CRISPR and CRISPR-flanking regions in deleted-direct repeat region Mycobacterium tuberculosis complex strains. *BMC Genomics*. 2017; 18 (1): 168.
 44. Pellegrini M, Marcotte EM, Thompson MJ, Eisenberg D, Yeates TO. Assigning protein functions by comparative genome analysis: protein phylogenetic profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96 (8): 4285–8.
 45. Emms DM, Kelly S. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome Biology*. 2015; 16: 157.
 46. Count CM.: evolutionary analysis of phylogenetic profiles with parsimony and likelihood. *Bioinformatics*. 2010; 26 (15): 1910–2.
 47. Sokal R, Michener C. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*. 1958; 38: 1409–1438.
 48. Monu, Meena LS. Roles of Triolein and Lipolytic Protein in the Pathogenesis and Survival of Mycobacterium tuberculosis: a Novel Therapeutic Approach. *Appl Biochem Biotechnol*. 2016; 178 (7): 1377–89.
 49. Deb C, Lee CM, Dubey VS, Daniel J, Abomoelak B, Sirakova TD, et al. A Novel In Vitro Multiple-Stress Dormancy Model for Mycobacterium tuberculosis Generates a Lipid-Loaded, Drug-Tolerant, Dormant Pathogen. *PLoS ONE*. 2009; 4 (6): e6077.
 50. Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of Mycobacterium tuberculosis. *FEMS Microbiol Rev*. 2000; 24 (4): 449–67.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ТАРГЕТНОМУ РЕДАКТИРОВАНИЮ ГЕНА *CFTR* С ПОМОЩЬЮ CRISPR-CAS9

С. А. Смирнихина¹✉, А. А. Анучина¹, К. С. Кочергин-Никитский¹, Э. П. Адильгереева¹, В. Д. Якушина¹, А. В. Лавров^{1,2}

¹ Лаборатория мутагенеза, Медико-генетический научный центр, Москва

² Кафедра молекулярной и клеточной генетики, медико-биологический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Муковисцидоз — тяжелое аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене *CFTR*, основной из которых в европейской популяции является F508del. Патогенетическая терапия существенно улучшила прогноз для жизни у пациентов с муковисцидозом, однако генная терапия не оказалась такой эффективной, как ожидалось. Геномное редактирование, в том числе с помощью CRISPR-Cas9, открывает новые возможности для этиотропного лечения, так как позволяет исправить мутации в клетках. Целью исследования было сравнение эффективности коррекции мутации F508del с помощью различных комбинаций направляющих РНК и Cas9 и повышение эффективности редактирования. Работу проводили на культуре клеток HEK293T, эффективность редактирования генома оценивали с помощью анализа T7E1, как на геномном, так и на плазмидном сайтах. Наиболее эффективной оказалась комбинация SaCas9 вместе с РНК на мутацию F508del — произошло редактирование 29% аллелей. Комбинация аналогичной направляющей РНК на F508del для SpCas9 показала небольшую эффективность редактирования, что связано с низкой экспрессией направляющей РНК. Были предприняты попытки увеличения экспрессии данной РНК с помощью разных подходов, однако повышения эффективности ее работы получено не было. Стабилизация направляющей РНК путем добавления в последовательность G-квадруплекса, укорочения и добавления GG в 5'-область также не принесла результатов. Вероятно, низкая эффективность работы использованной направляющей РНК обусловлена ее нуклеотидной последовательностью, что ограничивает ее использование.

Ключевые слова: муковисцидоз, CRISPR-Cas9, *CFTR*, геномное редактирование, мутация F508del, направляющие РНК

Финансирование: раздел «Редактирование *CFTR* локуса» поддержан грантом РНФ (Соглашение № 17-75-20095), разделы «Увеличение экспрессии направляющих РНК» и «Увеличение эффективности редактирования *CFTR* локуса» поддержаны Российской академией наук и государственным заданием ФГБНУ «МГНЦ».

✉ Для корреспонденции: Светлана Анатольевна Смирнихина
ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115522; smirnikhinas@gmail.com

Статья получена: 15.03.2018 Статья принята к печати: 20.03.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.022

EXPERIMENTAL APPROACHES TO THE TARGET EDITING OF THE *CFTR* GENE USING CRISPR-CAS9

Smirnikhina SA¹✉, Anuchina AA¹, Kochergin-Nikitsky KS¹, Adilgereeva EP¹, Yakushina VD¹, Lavrov AV^{1,2}

¹ Laboratory of Mutagenesis, Research Centre for Medical Genetics, Moscow

² Department of Molecular and Cellular Genetics, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Cystic fibrosis is a severe autosomal recessive disease caused by mutations in the *CFTR* gene. The most common *CFTR* mutation occurring in the European population is F508del. Advances in the management of patients with cystic fibrosis aimed at blocking disease progression have considerably improved the prognosis, but gene therapy has turned to be less effective than expected. Capable of correcting mutations direct in the cells, genome editing, and specifically the CRISPR-Cas9 technology, raises hope of causal treatment for patients with cystic fibrosis. The aim of this work was to compare and improve the efficacy of F508del editing using different combinations of guide RNAs and Cas9. The study was carried out in HEK293T cells. The efficacy of editing was assessed for both plasmid and genomic sites by T7E1 analysis. The best effect was demonstrated by a combination of SaCas9 and sgRNA targeting F508del: 29% of alleles were successfully edited. A combination of SpCas9 and a similar sgRNA showed low efficacy due to the low expression of this guide RNA. All attempts to improve its expression failed. SgRNA stabilization by introducing a G-quadruplex into the sgRNA sequence and adding GG to the 5'-region also did not work. Perhaps, low performance of this guide RNA is determined by its nucleotide sequence, limiting its use.

Keywords: cystic fibrosis, CRISPR-Cas9, *CFTR*, genome editing, F508del mutation, guide RNA

Funding: the section *Editing of the CFTR locus* was supported by the grant of the Russian Science Foundation (Agreement 17-75-20095), the sections *Increasing the expression of guide RNAs* and *Improving the efficacy of CFTR locus editing* were supported by the Russian Academy of Sciences and the state assignment of FASO Russia.

✉ Correspondence should be addressed: Svetlana Smirnikhina
Moskvorechie 1, Moscow, 115522; smirnikhinas@gmail.com

Received: 15.03.2018 Accepted: 20.03.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.022

Муковисцидоз (МВ, OMIM#219700) — аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), приводящими к нарушению транспорта ионов хлора и натрия через клеточную мембрану. Это одно из самых распространенных наследственных заболеваний с частотой встречаемости 1 на 4500 человек, при этом частота носительства мутаций гена *CFTR* достигает 1 на 25 человек [1]. Основные клинические симптомы связаны с поражением легких, являющимся основной причиной смерти пациентов [2], однако могут также вовлекаться поджелудочная железа, печень, кишечник. Самой частой мутацией в гене *CFTR* является F508del, приводящая к нарушению созревания белка CFTR и его полному отсутствию на поверхности клеток [3]. Патогенетическая терапия МВ в последние десятилетия достигла существенных результатов [4–7], однако этиотропного лечения до сих пор не существует.

Технологии геномного редактирования, включая использование CRISPR-Cas9, позволяют по-новому взглянуть на возможности генной терапии наследственных заболеваний [8]. Их можно использовать для коррекции («редактирования») мутаций и разрабатывать этиотропную терапию неизлечимых до сих пор болезней [9–12]. Опубликованные ранее работы по исправлению мутации F508del с помощью различных методов геномного редактирования [13–20] позволяют на их основе развивать и совершенствовать новые подходы к редактированию F508del. Существенный недостаток опубликованных работ — крайне низкая эффективность успешного редактирования (<<1% клеток), что является общей проблемой технологии геномного редактирования.

Для разработки более эффективного способа коррекции мутации F508del мы выбрали несколько направляющих РНК на место вокруг мутации и использовали разные ранее не использованные для этих целей ортологи Cas9, создав таким образом несколько комбинаций Cas9 + sgРНК для определения наиболее эффективной.

Целью работы было сравнение эффективности способов коррекции мутации F508del с помощью различных комбинаций направляющих РНК и Cas9 и повышение эффективности редактирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходные плазмиды для CRISPR-Cas9 были любезно предоставлены Feng Zhang (Addgene #71814 и #61591) и Keith Joung (Addgene #72249). Направляющие РНК (sgRNA) для SpCas9, SpCas9(HF4) и SaCas9 подобрали с помощью свободного программного обеспечения, разработанного Broad Institute (США) (<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgRNA-design>). В результате клонирования получили плазмиды (рис. 1). Для проверки эффективности полученных систем locus вокруг мутации F508del в 400 п.о. клонировали в плазмиду pGEM-TA-CFTR, которую котрансфицировали с плазмидой, экспрессирующей Cas9 и sgRNA. Клеточную культуру НЕК293Т (любезно предоставлена к. б. н. М. Ю. Скобловым, лаборатория функциональной геномики ФГБНУ «МГНЦ», Москва), культивировали в DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (PAA Laboratories GmbH, Австрия), 100 У/мл/100 мкг/мл пенициллин/стрептомицина и 4 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия). Для проверки роли температуры культивирования клетки после трансфекции культивировали в двух условиях: стандартных и при пониженной температуре. По стандартной методике культивировали 72 ч при 37 °С; при втором способе клетки сначала культивировали 24 ч при 37 °С, затем 48 ч при 30 °С. Кальций-фосфатную трансфекцию клеток НЕК293Т проводили в 12-луночных планшетах при 50% конfluентности, как описано ранее [21], суммарное количество плазмид на лунку составляло 1,5 или 5,5 мкг (при котрансфекции 1 или 5 мкг плазмиды с Cas9 и sgRNA и 0,5 мкг целевой плазмиды). Через 6 ч после трансфекции среду меняли на полную ростовую, содержащую 10% эмбриональной бычьей сыворотки. В качестве репортерной плазмиды использовали pEGFP-C1 (Clontech, США). Выделение ДНК проводили с помощью набора Genomic DNA-Tissue MiniPrep (ZymoResearch, США), согласно протоколу производителя. T7E1-анализ проводили, как описано ранее [22]: продукты амплификации фрагмента ДНК с предположительными вставками-делециями на месте двухцепочечного разреза подвергали нагреву и резкому охлаждению, образование гетеродуплексов фиксировали

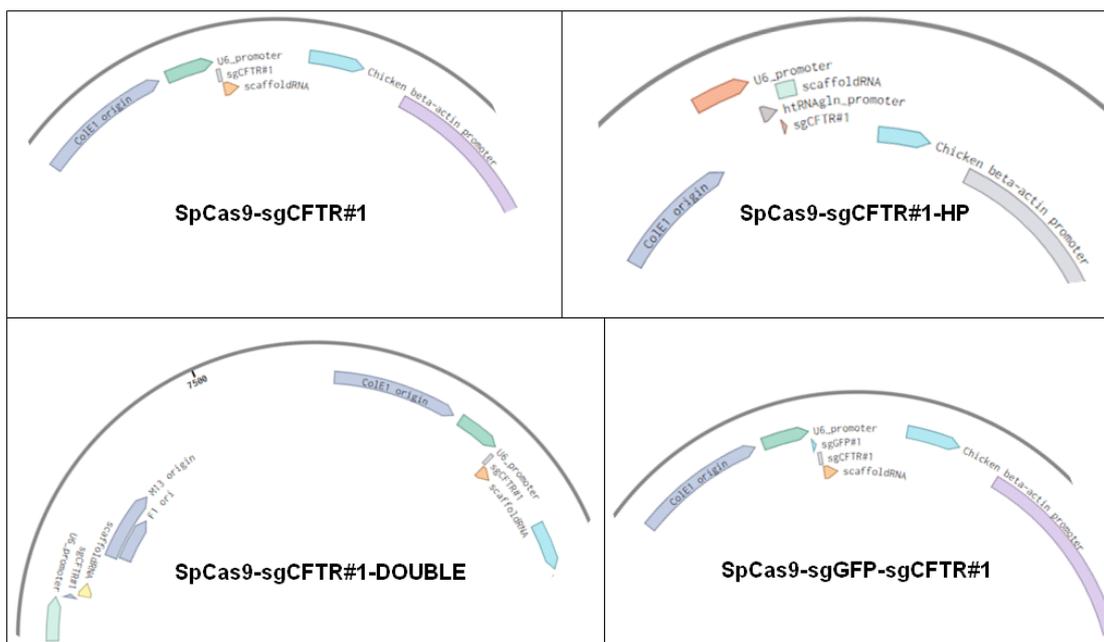


Рис. 1. Карты полученных плазмид для геномного редактирования локуса *CFTR* мутации F508del

по наличию дополнительных полос при электрофорезе после обработки гетеродуплексов эндонуклеазой T7E1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Редактирование *CFTR*-локуса

В работе проводили сравнение эффективности геномного редактирования мутации F508del в гене *CFTR* с использованием двух мутировавших SpCas9 (eSpCas9(1.1) [23] и SpCas9(HF4) [24]) и SaCas9 [25] с разными sgRNA в области мутации. Для SpCas9 выбрали три sgRNA на последовательность 10 экзона гена *CFTR* в месте мутации F508del (рис. 2). При этом PAM-последовательность для sgCFTR#1 появлялась только при наличии мутации F508del. Вторую sgRNA (sgCFTR#2) выбрали на последовательность ДНК рядом с мутацией, с ее помощью можно редактировать как последовательность с мутацией, так и дикий тип. Третью sgRNA (sgCFTR#3) выбрали на последовательность, находящуюся в 85 нуклеотидах от мутации [13]. SaCas9 использует в своей работе другой PAM, вследствие чего для этой нуклеазы выбрали отдельную sgRNA (saCFTR#3) — непосредственно на мутацию. Из-за того что в клеточной культуре HEK293T отсутствует мутация F508del и организация геномного сайта предположительно может влиять на эффективность редактирования, sgRNA тестировали также на специально созданной плазмиде с локусом вокруг мутации F508del, которую котрансфицировали с плазмидой, экспрессирующей Cas9 и sgRNA.

Наиболее эффективной комбинацией Cas9 и sgRNA оказалась комбинация SaCas9–saCFTR#3 — произошло редактирование 29% аллелей (рис. 3). SgCFTR#1 в комбинации с разными SpCas9 продемонстрировала в среднем эффективность редактирования, равную 13%. SgCFTR#2 показала эффективность редактирования в среднем 18% (16% на плазмидном сайте и 22% — на

геномном), sgCFTR#3 — в среднем 12% (6% на плазмидном сайте и 14% — на геномном). Активность редактирования с использованием sgCFTR#1 сопоставима или ниже активности других направляющих РНК, в том числе контрольной sgGFP, подобранной на ген *EGFP* (рис. 3).

Увеличение экспрессии направляющих РНК

Проведенная ранее работа показала, что невысокая эффективность редактирования с помощью sgCFTR#1 коррелирует с низким уровнем экспрессии этой sgRNA [22]. С целью увеличения экспрессии sgCFTR#1 в плазмиду добавили дополнительную кассету промотор + sgCFTR#1 (SpCas9–sgCFTR#1–DOUBLE), однако она не оказала существенного влияния на эффективность работы этой направляющей РНК (рис. 4). В работе использовали высокоэффективную sgRNA, подобранную к гену *EGFP* (sgGFP), в качестве положительного контроля. Так как sgGFP всегда активно экспрессировалась и показывала высокую эффективность, мы соединили две sgRNA, т. е. sgGFP и sgCFTR#1 (SpCas9–sgGFP–sgCFTR#1), однако слитная sgRNA привела к снижению эффективности редактирования локуса *CFTR* (рис. 4).

В ряде работ показано, что экспрессию можно увеличить с помощью гибридного промотора, т. е. состоящего из двух слитных промоторов [26]. Вероятный механизм действия — привлечение разными промоторами разных транскрипционных факторов. В используемых нами плаزمидегах sgRNA экспрессируется с промотора U6, который является стандартным для CRISPR-Cas9. Однако в ряде работ показано, что экспрессия sgRNA с промотора tRNA_{gln} выше [26, 27]. Поэтому в работе решено было клонировать в плазмиду гибридный промотор, состоящий из промоторов U6 и tRNA_{gln} (добавление HP после названия плазмиды). Как видно на рис. 5, эффективность работы всех sgRNA снизилась, за исключением sgCFTR#1, чья активность незначительно увеличилась.

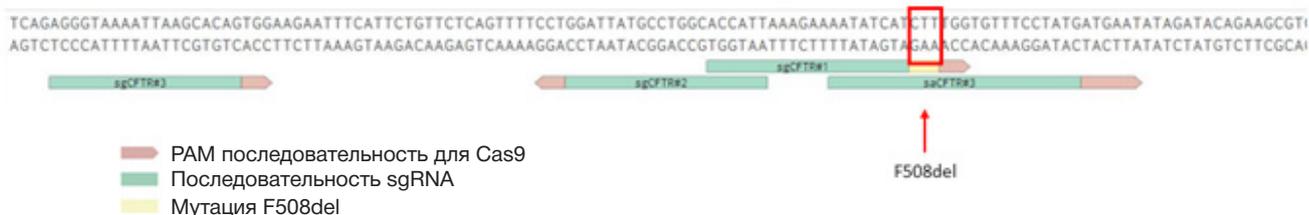


Рис. 2. Используемые в работе sgRNA на локус *CFTR*

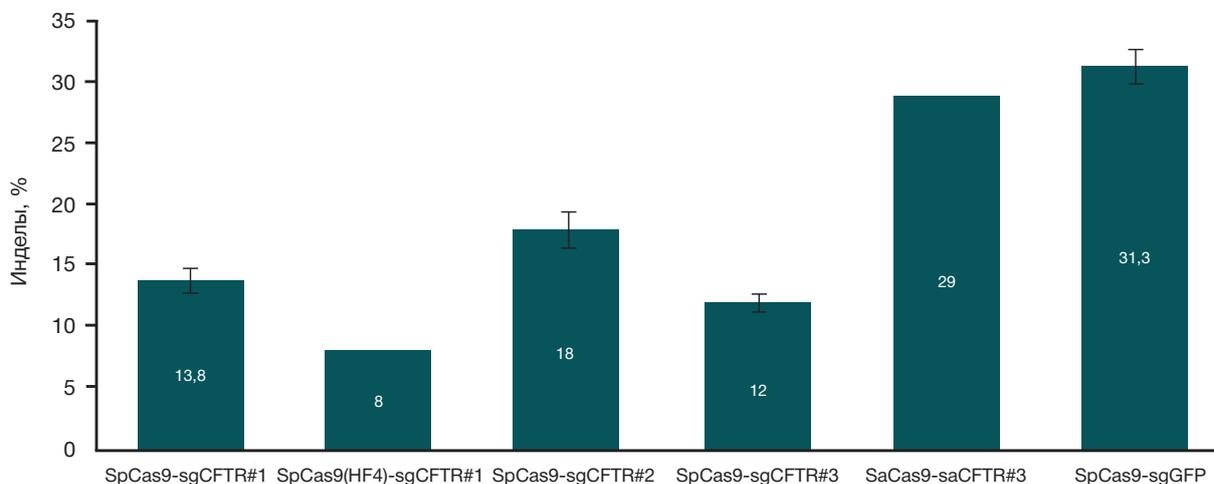


Рис. 3. Сравнение эффективности редактирования *CFTR* и *EGFP* в культуре HEK293T через 48–72 ч после трансфекции. Данные представлены как среднее значение со стандартной ошибкой среднего

Увеличение эффективности редактирования *CFTR*-локуса

Известно, что молекулы sgRNA размером короче 20 нуклеотидов и начинающиеся на G- или GG-нуклеотид более эффективны [28]. SgCFTR#2 и SgCFTR#3 содержали в 5'-области два нуклеотида GG, поэтому в работе укоротили молекулу sgRNA с 5'-конца до 17 нуклеотидов (SpCas9-sgCFTR#2(GG17) и SpCas9-sgCFTR#3(GG17) соответственно). SgCFTR#1 не содержала в 5'-области GG, поэтому ее укоротили до 19 нуклеотидов и заменили начальные нуклеотиды CC на GG (SpCas9-sgCFTR#1(gg19)). Модификации sgCFTR#1 и sgCFTR#3 привели к уменьшению их активности с 20,3 и 11,8 до 8,7% и 0%, соответственно (рис. 6), тогда как модификация sgCFTR#2 увеличила ее эффективность с 10,5 до 22,1%.

Предполагая, что эффективность работы направляющих РНК связана с их стабильностью, к последовательностям sgCFTR#1 и sgGFP с 5'-конца добавили последовательность CACCGGGAGGGCGGGGAGGG, чтобы создать условия для образования G-квадруплексов sgCFTR#1quad и sgGFPquad соответственно, повышающих стабильность sgRNA [29]. Результаты работы показали, что эффективность разрезания целевой ДНК с использованием измененных

направляющих РНК уменьшилась из-за снижения их экспрессии в 2–16 раз относительно немодифицированных sgRNA [22].

Наконец, осуществляли попытки стабилизации нуклеазы SpCas9 с помощью временного культивирования трансфицированных клеток при 30 °С [14, 30]. Эффективность редактирования *CFTR* в результате этого эксперимента снизилась почти в 2 раза — с 17,6 до 10,9% (табл.).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Попытки коррекции мутаций в гене *CFTR* с помощью геномного редактирования начались в 2012 г. [14], однако до сих пор нет готового эффективного решения. Связано это, прежде всего, с низкой эффективностью данных подходов. Небольшой процент клеток с исправленной мутацией заставляет использовать клеточную селекцию [13, 16], что существенно увеличивает себестоимость методики и удлиняет процесс получения необходимой клеточной культуры. Кроме того, такой подход не позволяет лечить заболевание системно.

Развивающиеся технологии геномного редактирования позволяют усовершенствовать систему, увеличивая ее эффективность и специфичность. В своей работе

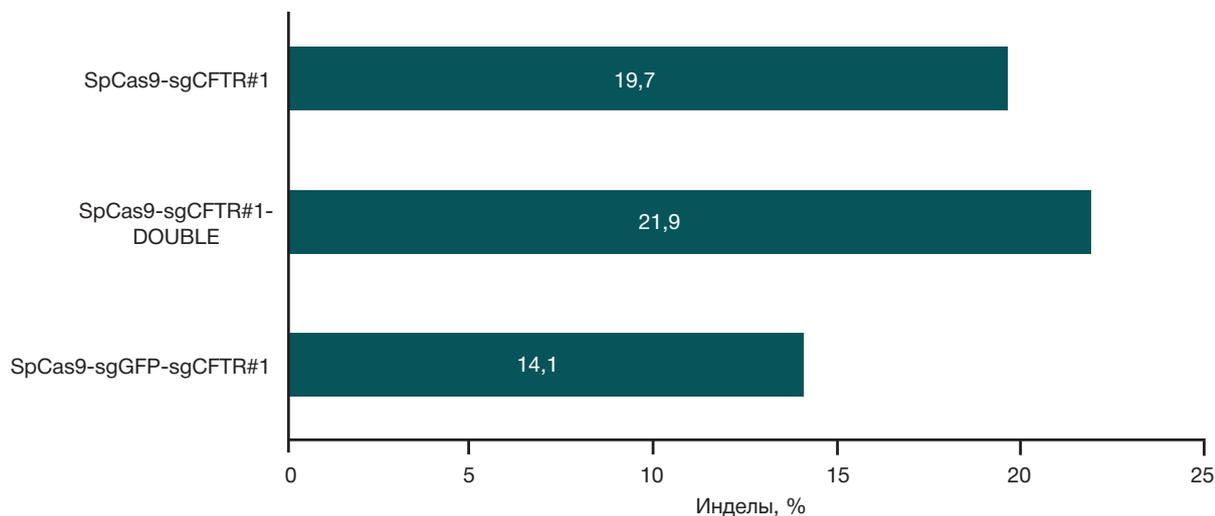


Рис. 4. Сравнение эффективности редактирования *CFTR* в культуре HEK293T. Данные представлены как среднее значение

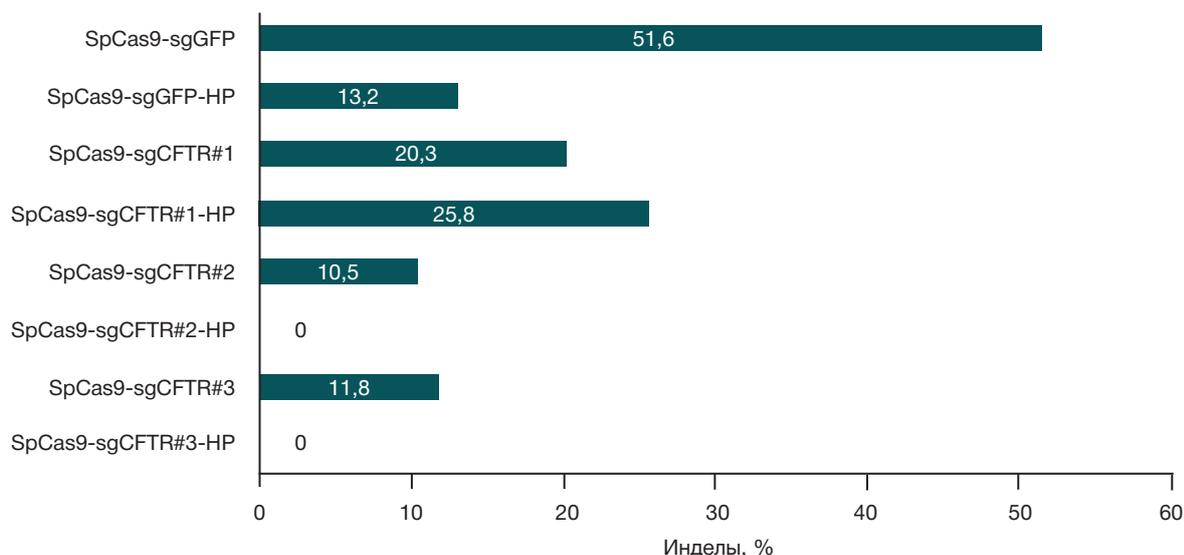


Рис. 5. Сравнение эффективности редактирования *CFTR* и *EGFP* в культуре HEK293T с использованием sgRNA, экспрессирующихся со стандартного промотора U6 и с гибридного промотора U6-tRNAgln (плазмиды HP). Данные представлены как среднее значение

мы используем более специфичные ферменты для редактирования генома [23, 24], что повышает безопасность методики. Кроме того, мы разрабатываем метод редактирования, работающий только на мутировавшем сайте, используя действие направляющих РНК непосредственно на мутацию F508del. Это открывает новые возможности: должно происходить редактирование не выделенных клеток, а в организме, так как меняться будут только аллели с мутацией. К тому же, новый подход позволит избежать повторного разрезания уже отредактированного локуса.

Однако в ходе работы было показано, что эффективность редактирования с помощью sgCFTR#1, подобранной на мутацию F508del, ниже по сравнению с большинством используемых нами sgRNA. Основной причиной низкой эффективности стала низкая экспрессия sgCFTR#1 в клетках [22]. Мы испробовали несколько способов усилить экспрессию этой направляющей РНК: добавили в плазмиду дополнительную кассету (промотор + sgCFTR#1), соединили sgCFTR#1 с более активной sgGFP, использовали гибридный промотор U6-tRNA^{Gln}, однако ни один из способов не повысил эффективность работы sgCFTR#1.

Ранее было показано, что для инициации транскрипции с промотора U6 необходимо наличие на 5'-конце направляющей РНК нуклеотидов G или GG [28], поэтому мы либо укоротили имеющиеся sgRNA до первой G, либо добавили их вместо начальных нуклеотидов, чтобы повысить экспрессию и, соответственно, активность sgRNA. Однако такой подход также не привел к ожидаемым результатам.

Исходя из того, что изначально у направляющих РНК был одинаковый промотор, а именно U6, можно предположить, что транскрипция обеих sgRNA должна быть одинаковой.

Разный уровень экспрессии может быть обусловлен более быстрой деградацией sgCFTR#1 по сравнению с sgGFP. Так, в исследовании скрининга большого числа направляющих РНК [29] показано, что sgRNA, имеющие в своем составе G-богатые участки (более 8 оснований), более стабильны из-за формирования G-квадруплексов. Но, как и в случае экспериментов по усилению экспрессии, G-квадруплекс не увеличил активность sgCFTR#1 [22].

В ряде работ сообщается, что нуклеаза *FokI* более стабильно работает при 30 °C [14, 30]. Мы предположили, что для нуклеазы Cas9 низкая температура культивирования трансфицированных клеток также может быть эффективной, однако такой подход не привел к повышению активности редактирования [22].

Проведенные *in vitro* эксперименты показывают, что до 41% направляющих РНК не активны в отношении таргетного локуса [31]. В качестве основной причины рассматривается нуклеотидный состав sgRNA: например, T- и TT-богатые последовательности снижают эффективность [32], присутствие разных нуклеотидов в определенных позициях направляющей РНК также достоверно ассоциировано с разной активностью sgRNA [31]. Кроме того, могут играть роль и вторичные структуры, образуемые направляющими РНК [31]. Если низкая эффективность работы sgRNA связана с ее последовательностью, то единственным решением в таком случае является подбор новой sgRNA.

Выводы

По результатам редактирования локуса *CFTR* в клеточной культуре HEK293T, наиболее эффективна комбинация из SaCas9 и sgRNA, подобранная на мутацию F508del (редактирование составило 29%). SgCFTR#1, подобранная

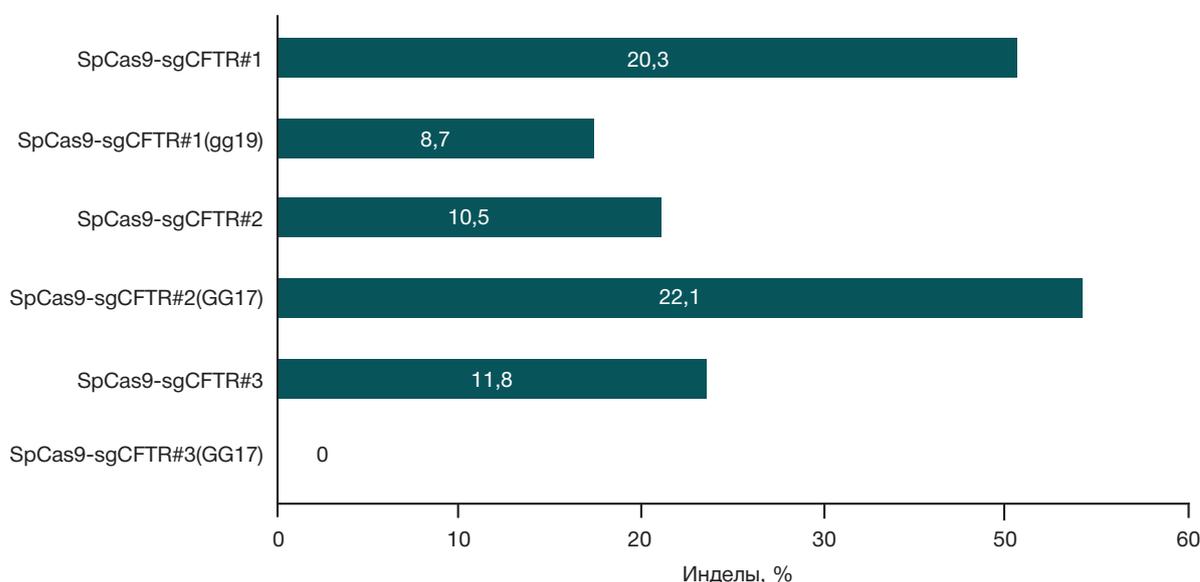


Рис. 6. Сравнение эффективности редактирования *CFTR* в культуре HEK293T с использованием модифицированных sgRNA. Данные представлены как среднее значение

Таблица. Сравнение эффективности редактирования гена *CFTR* при разных условиях культивирования трансфицированных клеток HEK293T

Условия культивирования	Трансфицированные плазмиды	Инделлы (среднее), %
72 ч при 37 °C	SpCas9-sgCFTR#1 + pGEM-TA-CFTR	17,6
	pGEM-TA-CFTR	0
24 ч при 37 °C, 48 ч при 30 °C	SpCas9-sgCFTR#1 + pGEM-TA-CFTR	10,9
	pGEM-TA-CFTR	0

на мутацию F508del, в комбинации в двумя разными SpCas9 показала наименьшую эффективность: 13,8% — с Cas9(1.1) и 8% — с Cas9(HF4), что связано с ее низкой экспрессией. Предприняты попытки увеличить экспрессию sgCFTR#1 путем добавления еще одной экспрессирующей кассеты в плазмиду, соединения этой sgRNA с активной sgGFP и использования гибридного промотора, существенного повышения эффективности работы sgCFTR#1 не дали. Попытки стабилизировать sgCFTR#1 путем добавления в ее последовательность G-квадруплекса, укорочения

и добавления GG в 5'-область также не принесли результатов. Культивирование редактируемых клеток при более низкой температуре не привело к повышению эффективности редактирования. Таким образом, низкая эффективность работы sgCFTR#1, вероятно, является следствием ее нуклеотидной последовательности, и необходимо использовать другие направляющие РНК, либо другие Cas9, например, SaCas9, с другими PAM-последовательностями, расширяющими возможности подбора направляющих РНК на мутацию F508del.

Литература

1. Красовский С. А., Черняк А. В., Воронкова А. Ю., Амелина Е. Л., Каширская Н. Ю., Кондратьева Е. И. и др. (редакторы). Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2016 год. М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2018, 64 с.
2. Burney TJ, Davies JC. Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. *Appl Clin Genet*. 2012 May 29; 5: 29–36. DOI: 10.2147/TACG.S8873.
3. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J Intern Med*. 2015; 277: 55–166.
4. Cohen-Cymberek M, Shoseyov D, Kerem E. Managing cystic fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jun 1; 183 (11): 1463–71. DOI: 10.1164/rccm.201009-1478CI.
5. Whiting P, Al M, Burgers L, Westwood M, Ryder S, Hoogendoorn M, et al. Ivacaftor for the treatment of patients with cystic fibrosis and the G551D mutation: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess*. 2014 Mar; 18 (18): 1–106.
6. Mayer M. Lumacaftor-ivacaftor (Orkambi) for cystic fibrosis: behind the 'breakthrough'. *Evid Based Med*. 2016 Jun; 21 (3): 83–6.
7. Cholon DM, Esther CR Jr, Gentsch M. Efficacy of lumacaftor-ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis patients homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Expert Rev Precis Med Drug Dev*. 2016; 1 (3): 235–43.
8. Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*. 2014 Sep 15; 23 (R1): R40–6.
9. Смирнихина С. А., Лавров А. В. Генная терапия наследственных заболеваний с помощью технологии CRISPR/Cas9 in vivo. *Медицинская генетика*. 2016; 15 (9): 3–11.
10. Hockemeyer D, Jaenisch R. Induced pluripotent stem cells meet genome editing. *Cell Stem Cell*. 2016 May 5; 18 (5): 573–86.
11. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Mol Ther*. 2016 Mar; 24 (3): 430–46.
12. Prakash V, Moore M, Yáñez-Muñoz RJ. Current Progress in Therapeutic Gene Editing for Monogenic Diseases. *Mol Ther*. 2016 Mar; 24 (3): 465–74.
13. Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E, et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Rep*. 2015 Sep 1; 12 (9): 1385–90.
14. Lee CM, Flynn R, Hollywood JA, Scallan MF, Harrison PT. Correction of the Δ F508 Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Zinc-Finger Nuclease Homology-Directed Repair. *BioResearch Open Access*. 2012; 1 (3): 99–108.
15. Suzuki S, Sargent RG, Illek B, Fischer H, Esmaili-Shandiz A, Yezzi MJ, et al. TALENs Facilitate Single-step Seamless SDF Correction of F508del CFTR in Airway Epithelial Submucosal Gland Cell-derived CF-iPSCs. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016 Jan 5; 5: e273.
16. Hollywood JA, Lee CM, Scallan MF, Harrison PT. Analysis of gene repair tracts from Cas9/gRNA double-stranded breaks in the human CFTR gene. *Sci Rep*. 2016 Aug 25; 6: 32230.
17. Crane AM, Kramer P, Bui JH, Chung WJ, Li XS, Gonzalez-Garay ML, et al. Targeted correction and restored function of the CFTR gene in cystic fibrosis induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2015 Apr 14; 4 (4): 569–77.
18. Bednarski C, Tomczak K, Vom Hövel B, Weber WM, Cathomen T. Targeted Integration of a Super-Exon into the CFTR Locus Leads to Functional Correction of a Cystic Fibrosis Cell Line Model. *PLoS One*. 2016 Aug 15; 11 (8): e0161072.
19. Camarasa MV, Gálvez VM. Robust method for TALEN-edited correction of pF508del in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Feb 9; 7: 26.
20. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*. 2013 Dec 5; 13 (6): 653–58.
21. Смирнихина С. А., Банников А. В., Лавров А. В. Оптимизация условий трансфекции клеточной культуры CFTE29o- для разработки редактирования мутации F508del в гене CFTR. *Медицинская генетика*. 2016; 15 (8): 36–9.
22. Смирнихина С. А., Банников А. В., Анучина А. А., Кочергин-Никитский К. С., Адильгереева Э. П., Лавров А. В. Факторы, влияющие на эффективность CRISPR/Cas9 для коррекции мутации F508del при муковисцидозе. *Медицинская генетика*, 2017; 16 (11): 32–7.
23. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016 Jan 1; 351 (6268): 84–8.
24. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 2016; 529: 490–95.
25. Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, et al. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*. 2015 Apr 9; 520 (7546): 186–91.
26. Schwartz CM, Hussain MS, Blenner M, Wheeldon I. Synthetic RNA Polymerase III Promoters Facilitate High-Efficiency CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol*. 2016 Apr 15; 5 (4): 356–9. DOI: 10.1021/acssynbio.5b00162.
27. Mefferd AL, Kornepati AV, Bogerd HP, Kennedy EM, Cullen BR. Expression of CRISPR/Cas single guide RNAs using small tRNA promoters. *RNA*. 2015 Sep; 21 (9): 1683–9. DOI: 10.1261/rna.051631.115.
28. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. 2014 Apr; 32 (4): 347–55. DOI: 10.1038/nbt.2842.
29. Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods*. 2015 Oct; 12 (10): 982–88.
30. Doyon Y, Choi VM, Xia DF, Vo TD, Gregory PD, Holmes MC. Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nat Methods*. 2010 Jun; 7 (6): 459–60.
31. Liu X, Homma A, Sayadi J, Yang S, Ohashi J, Takumi T. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*. 2016 Jan 27; 6: 19675. DOI: 10.1038/srep19675.
32. Kuan PF, Powers S, He S, Li K, Zhao X, Huang B. A systematic evaluation of nucleotide properties for CRISPR sgRNA design. *BMC Bioinformatics*. 2017 Jun 6; 18 (1): 297. DOI: 10.1186/s12859-017-1697-6.

References

1. Krasovsky SA, Chernyak AV, Voronkov AY, Amelina EL, Kashirskaya NY, Kondratieva EI, et al. Register of cystic fibrosis patients in Russian Federation. 2016. Moskva: «MEDPRAKTIKA-M», 2018, 64 s.
2. Burney TJ, Davies JC. Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. *Appl Clin Genet*. 2012 May 29; 5: 29–36. DOI: 10.2147/TACG.S8873.
3. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J Intern Med*. 2015; 277: 55–166.
4. Cohen-Cymbberknoh M, Shoseyov D, Kerem E. Managing cystic fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jun 1; 183 (11): 1463–71. DOI: 10.1164/rccm.201009-1478CI.
5. Whiting P, Al M, Burgers L, Westwood M, Ryder S, Hoogendoorn M, et al. Ivacaftor for the treatment of patients with cystic fibrosis and the G551D mutation: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess*. 2014 Mar; 18 (18): 1–106.
6. Mayer M. Lumacaftor-ivacaftor (Orkambi) for cystic fibrosis: behind the 'breakthrough'. *Evid Based Med*. 2016 Jun; 21 (3): 83–6.
7. Cholon DM, Esther CR Jr, Gentzsch M. Efficacy of lumacaftor-ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis patients homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Expert Rev Precis Med Drug Dev*. 2016; 1 (3): 235–43.
8. Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*. 2014 Sep 15; 23 (R1): R40–6.
9. Smirnikhina SA, Lavrov AV. Gennaja terapija nasledstvennyh zabolevanij s pomoshh'ju tehnologii CRISPR/Cas9 in vivo. *Medicinskaja genetika*. 2016; 15 (9): 3–11.
10. Hockemeyer D, Jaenisch R. Induced pluripotent stem cells meet genome editing. *Cell Stem Cell*. 2016 May 5; 18 (5): 573–86.
11. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Mol Ther*. 2016 Mar; 24 (3): 430–46.
12. Prakash V, Moore M, Yáñez-Muñoz RJ. Current Progress in Therapeutic Gene Editing for Monogenic Diseases. *Mol Ther*. 2016 Mar; 24 (3): 465–74.
13. Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E, et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Rep*. 2015 Sep 1; 12 (9): 1385–90.
14. Lee CM, Flynn R, Hollywood JA, Scallan MF, Harrison PT. Correction of the Δ F508 Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Zinc-Finger Nuclease Homology-Directed Repair. *BioResearch Open Access*. 2012; 1 (3): 99–108.
15. Suzuki S, Sargent RG, Illek B, Fischer H, Esmaili-Shandiz A, Yezzi MJ, et al. TALENs Facilitate Single-step Seamless SDF Correction of F508del CFTR in Airway Epithelial Submucosal Gland Cell-derived CF-iPSCs. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016 Jan 5; 5: e273.
16. Hollywood JA, Lee CM, Scallan MF, Harrison PT. Analysis of gene repair tracts from Cas9/gRNA double-stranded breaks in the human CFTR gene. *Sci Rep*. 2016 Aug 25; 6: 32230.
17. Crane AM, Kramer P, Bui JH, Chung WJ, Li XS, Gonzalez-Garay ML, et al. Targeted correction and restored function of the CFTR gene in cystic fibrosis induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2015 Apr 14; 4 (4): 569–77.
18. Bednarski C, Tomczak K, Vom Hövel B, Weber WM, Cathomen T. Targeted Integration of a Super-Exon into the CFTR Locus Leads to Functional Correction of a Cystic Fibrosis Cell Line Model. *PLoS One*. 2016 Aug 15; 11 (8): e0161072.
19. Camarasa MV, Gálvez VM. Robust method for TALEN-edited correction of pF508del in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Feb 9; 7: 26.
20. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*. 2013 Dec 5; 13 (6): 653–58.
21. Smirnikhina SA, Bannikov AV, Lavrov AV. Optimizacija uslovij transfekcii kletочноj kul'tury CFTE290- dlja razrabotki redaktirovanija mutacii F508del v gene CFTR. *Medicinskaja genetika*. 2016; 15 (8): 36–9.
22. Smirnikhina SA, Bannikov AV, Anuchina AA, Kochergin-Nikitsky KS, Adilgereeva EP, Lavrov AV. Faktory, vlijajushhie na jeffektivnost' CRISPR/Cas9 dlja korrekcii mutacii F508del pri mukoviscidoze. *Medicinskaja genetika*, 2017; 16 (11) s. 32–7.
23. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016 Jan 1; 351 (6268): 84–8.
24. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 2016; 529: 490–95.
25. Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, et al. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*. 2015 Apr 9; 520 (7546): 186–91.
26. Schwartz CM, Hussain MS, Blenner M, Wheeldon I. Synthetic RNA Polymerase III Promoters Facilitate High-Efficiency CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol*. 2016 Apr 15; 5 (4): 356–9. DOI: 10.1021/acssynbio.5b00162.
27. Mefferd AL, Kornepati AV, Bogerd HP, Kennedy EM, Cullen BR. Expression of CRISPR/Cas single guide RNAs using small tRNA promoters. *RNA*. 2015 Sep; 21 (9): 1683–9. DOI: 10.1261/rna.051631.115.
28. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. 2014 Apr; 32 (4): 347–55. DOI: 10.1038/nbt.2842.
29. Moreno-Mateos MA, Vejnár CE, Beaudoin JD, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods*. 2015 Oct; 12 (10): 982–88.
30. Doyon Y, Choi VM, Xia DF, Vo TD, Gregory PD, Holmes MC. Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nat Methods*. 2010 Jun; 7 (6): 459–60.
31. Liu X, Homma A, Sayadi J, Yang S, Ohashi J, Takumi T. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*. 2016 Jan 27; 6: 19675. DOI: 10.1038/srep19675.
32. Kuan PF, Powers S, He S, Li K, Zhao X, Huang B. A systematic evaluation of nucleotide properties for CRISPR sgRNA design. *BMC Bioinformatics*. 2017 Jun 6; 18 (1): 297. DOI: 10.1186/s12859-017-1697-6.

CAS13A: ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСНОЙ РНК

А. С. Савинова^{1,2}, Е. Ю. Коптев¹, Е. В. Усачев¹, А. П. Ткачук¹, В. А. Гушчин^{1,3} ✉

¹ Лаборатория трансляционной медицины, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

² Кафедра биотехнологии, факультет биотехнологии и промышленной экологии, Российский химико-технологический факультет имени Д. И. Менделеева, Москва

³ Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Использование CRISPR-Cas систем для редактирования геномов организмов в последнее время стало одним из магистральных научных направлений. Между тем белки системы CAS можно применять для разработки методов молекулярной диагностики. Традиционные подходы к идентификации микроорганизмов имеют ряд недостатков: они времязатратны (культуральные методы диагностики), недостаточно чувствительны (иммунологические методы), имеют высокую себестоимость и методически сложны (ПЦР, секвенирование). Целью работы было получение функционально активного препарата белка Cas13a и изучение его поведения в различных условиях, в том числе при изменении концентрации мишени, для дальнейшего использования в диагностических целях. Была создана генетическая экспрессионная конструкция, имеющая на 5'-конце T7-промотор и ген *cas13a* бактерии *Leptotrichia wadei*. Получены препараты функционально активной программируемой РНКазы белка Cas13a, направляющей РНК, а также РНК вируса гриппа Б (РНК-мишень). Функциональную активность РНКазы белка Cas13a определяли по появлению флуоресцентного сигнала в реакционной смеси, содержащей направляющую РНК, РНК-мишень, молекулярный РНК-маячок. Показано, что полученный препарат белка Cas13a способен специфически выявлять мишень на примере фрагментов РНК вируса гриппа Б и не обладает неспецифическими видами РНКазной активности. Данное исследование может стать основой для создания нового быстрого специфичного и чувствительного метода идентификации микроорганизмов.

Ключевые слова: ПЦР, диагностика, инфекционные заболевания, CRISPR-Cas система, Cas13a

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Алексеевич Гушчин
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; wowaniada@gmail.com, vladimir.a.gushchin@gamaleya.org

Статья получена: 31.05.2018 **Статья принята к печати:** 07.06.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.021

CAS13A: PURIFICATION AND USE FOR DETECTION OF VIRAL RNA

Savinova AS^{1,2}, Koptev EYu¹, Usachev EV¹, Tkachuk AP¹, Gushchin VA^{1,3} ✉

¹ Laboratory of Translational Biomedicine, Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

² Department of Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Industrial Ecology, Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow

³ Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow

The use of CRISPR-Cas systems in genome editing has recently become one of the major research areas. Meanwhile, CAS proteins can be employed to develop novel techniques for molecular diagnostics. Traditional approaches to the identification of microorganisms have a few drawbacks: they are time-consuming (microbiological methods), insufficiently sensitive (immunoassays), expensive or labor-intensive (PCR, sequencing). The aim of this work was to obtain a functionally active Cas13a protein that could be used as a diagnostic tool and study its behavior under different conditions and at various target concentrations. We constructed an expression vector with the *cas13a* gene of *Leptotrichia wadei* under the control of T7 promoter. We obtained a functionally active Cas13a RNase with pre-programmed activity, guide RNA, and a fragment of influenza B RNA sequence serving as a target. The functional activity of Cas13 RNase was assessed by fluorescence in the reaction mix containing guide RNA, target RNA, and a molecular RNA beacon. The obtained protein Cas13a was able to specifically recognize the target and did not exhibit any non-specific RNase activity. This study can become a basis for developing a novel, rapid, specific and sensitive method for pathogen detection.

Keywords: PCR, diagnostics, infectious diseases, CRISPR-Cas system, Cas13a

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir Gushchin
Gamalei 18, Moscow, 123098; wowaniada@gmail.com, vladimir.a.gushchin@gamaleya.org

Received: 31.05.2018 **Accepted:** 07.06.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.021

На протяжении многих лет человечество борется с инфекционными заболеваниями. Особо опасны инфекции, вызывающие вспышки и эпидемии [1]. Непрерывно ведется разработка новых методов диагностики, так как именно от точности диагностики зависит эффективность последующей терапии. Полимеразная цепная реакция

(ПЦР) в отличие от классических микробиологических методов идентификации микроорганизмов, основанных на культивировании с использованием дифференциально-диагностических сред, позволяет определять микроорганизмы быстро и независимо от особенностей их жизненного цикла. Активному внедрению ПЦР

способствует развитие методов секвенирования и легкий доступ к последовательностям геномов в открытых базах данных [2].

Тем не менее потребность в разработке новых методов молекулярной диагностики по-прежнему остается. Расширение спектра использования ПЦР ограничивают высокая стоимость оборудования, необходимость создания специализированных лабораторных помещений и отсутствие персонала, имеющего высокую квалификацию. В качестве альтернативы ПЦР предлагаются различные варианты мобильных биосенсоров использующих комбинацию физических и биохимических подходов [3–5], а также подходы, совсем не требующие сложных приборов [6, 7]. Наиболее перспективной, по нашему мнению, разработкой, сочетающей высокую специфичность и чувствительность на уровне единичных молекул, является SHERLOCK (*specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking*) [8, 9].

SHERLOCK основан на комбинировании изотермической амплификации нуклеиновых кислот исследуемого образца с работой Cas13a и позволяет детектировать как молекулы ДНК, так и РНК. Изотермическая амплификация используется для накопления мишени, а Cas13a выполняет функцию специфического сенсора, позволяющего точно распознавать заданные мишени и различать даже единичные нуклеотидные замены [9].

Активация нуклеазной активности Cas13a начинается со связывания направляющей РНК (crРНК) с Cas13a, после чего в структуре белка происходят значительные конформационные изменения, цель которых — формирование канала для дальнейшего связывания РНК-мишени [10]. Когда Cas13a встречается с РНК-мишенью, происходит образование дуплекса crРНК:РНК-мишень в положительно заряженном канале «NUC lobe». РНК-мишень служит своеобразным активатором, так как образование дуплекса катализирует сближение каталитических доменов с последующим формированием сайта расщепления РНК. Использование зонда РНК позволяет визуализировать процесс работы Cas13 по накоплению флуоресцентного сигнала.

Целью публикуемой работы было получение функционально активного препарата Cas13a, а также изучение его активности в различных условиях, в том числе при изменении концентраций мишени. В качестве мишени был использован фрагмент РНК вируса гриппа Б.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение рекомбинантного белка LwCas13a

Для получения препарата рекомбинантного белка Cas13a *Leptotrichia wadei* (LwCas13a) ген с оптимизированным кодоновым составом, синтезированный de novo (Евроген, Россия), был встроен в генетический экспрессионный вектор pET42b(+) под контролем *lacT7* промотора. Экспрессию гена проводили в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS, со стороны С-конца Cas13a имел октогистидиновую метку. Индукцию осуществляли с использованием изопропил-β-D-1-тиогаалактопиранозид (ИПТГ). Замороженную биомассу ресуспендировали в лизирующем буфере (20 мМ Трис-НСl рН 8,8; 500 мМ NaCl; 5 мМ β-меркаптоэтанол) и разрушали под воздействием циклических ультразвуковых импульсов. Лизат осветляли центрифугированием при 15 000 г в течение 20 мин, супернатант использовали для проведения аффинной хроматографии на автоматизированной

системе среднего давления NGC Discover™ 10 (Bio-Rad, США), использовали колонку HisPrep FF 16/10 (GE, Германия) объемом 20 мл, заряженную ионами Ni²⁺. Для освобождения от неспецифически связавшихся примесей в буферные растворы для хроматографии добавляли Triton X-100 до конечной концентрации 0,1%. Элюцию белка осуществляли в линейном градиенте имидазола до конечной концентрации 0,5 М. После хроматографии, фракции, содержащие Cas13a, объединяли и диализовали против буфера хранения (20 мМ Трис-НСl рН 8,0; 200 мМ NaCl; 0,1 мМ ЭДТА). Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически с помощью прибора Implen NanoPhotometer (IMPLEN, Германия) при длине волны 280 нм. Расчет концентрации проводили с учетом коэффициента экстинкции [11, 12].

Получение РНК-мишени и направляющей РНК

Для получения направляющей РНК и РНК-мишени использовали метод ПЦР с последующей транскрипцией ПЦР-продукта с помощью qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) по протоколам производителя. Для получения направляющей РНК использовали искусственно синтезированные олигонуклеотиды-праймеры, обладающие участком самокомплементарности. Для получения РНК-мишени амплифицировали фрагмент плазмиды, несущей последовательность генома вируса гриппа Б и фага MS2. Транскрипцию *in vitro* с полученных ПЦР-продуктов проводили с использованием MEGAscript® T7 Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Определение сторонних видов нуклеазных активностей LwCas13a

В качестве аналитического сигнала для проверки сторонних видов нуклеазных активностей LwCas13a использовали флуоресценцию, появляющуюся при расщеплении репортерной молекулы РНК RNaseAlert v2 Substrate (Thermo fisher scientific, США). Репортерная молекула РНК представляет собой олигонуклеотид-маячок с флуоресцентным красителем на 5'-конце и его гасителем на 3'-конце. При расщеплении молекулы краситель отделяется от гасителя и испускает квант света в зеленом спектре (длина волны 520 нм). Препарат LwCas13a в конечной концентрации 450 нМ инкубировали в реакционной смеси состоящей из нуклеазного буфера и репортерной РНК (40 мМ Трис-НСl рН 7,3; 60 мМ NaCl; 6 мМ MgCl₂; 125 нМ RNaseAlert v2 Substrate) в течение 2 ч при 37 °С, изменение флуоресценции регистрировали в реальном времени с использованием амплификатора QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). В качестве положительного контроля использовали РНКазу А (Thermo fisher scientific, США), в качестве отрицательного — чистую репортерную РНК.

Проверка эндонуклеазной активности белка LwCas13a

Реакционная смесь для определения эндонуклеазной активности LwCas13a состояла из нуклеазного буфера (40 мМ Трис-НСl рН 7,3; 60 мМ NaCl; 6 мМ MgCl₂), 450 мМ LwCas13a, 22,5 нМ crРНК, 125 мМ RNaseAlert v2 Substrate, 2 мкл RiboLock RNase Inhibitor, 100 нг РНК вируса табачной мозаики (в качестве фона) и различных концентраций РНК-мишени. Детекцию флуоресцентного сигнала осуществляли в реальном времени в течение 2 ч при 37 °С

с использованием амплификатора QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение препарата рекомбинантного LwCas13a

Препарат рекомбинантного белка LwCas13a получали с применением аффинной хроматографии. Анализ фракций в системе денатурирующего электрофореза белков показал, что во время индукции клетки *E. coli* продуцируют растворимый белок с молекулярной массой, сопоставимой с расчетной для LwCas13a (139,8 кДа) (рис. 1).

Оптимизация концентрации репортерной РНК (RNaseAlert) в реакционной смеси

Для получения оптимальных значений флуоресценции провели серию модельных экспериментов с использованием РНКазы А (рис. 2). Для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация субстрата 125 нМ, так как именно при этом значении обеспечивался максимальный динамический диапазон в 100 000 условных единиц флуоресценции.

Проверка сторонних видов РНКазной активности препарата LwCas13a

Проверку препарата белка LwCas13a на наличие неспецифических видов РНКазной активности проводили с помощью инкубации белка LwCas13a с флуоресцентным субстратом RNaseAlert v2 Substrate в отсутствие сРНК и РНК-мишени в течение 2 ч, изменения флуоресцентного сигнала при этом не наблюдалось. В качестве положительного контроля инкубировали флуоресцентный субстрат с РНКазой А, в качестве отрицательного контроля — с препаратом репортерной РНК (рис.3). Можно заключить, что по разработанной методике был получен препарат белка LwCas13a, не проявляющий

неспецифических видов РНКазной активности, что позволило перейти к изучению свойств программируемой РНКазы.

Определение чувствительности метода детекции на основе препарата белка LwCas13a на примере вируса гриппа Б

Определение чувствительности системы детекции с использованием белка LwCas13a проводили в модельных экспериментах с вирусной РНК-мишенью фрагмента генома вируса гриппа Б. В ходе экспериментов с препаратами LwCas13a нижним детектируемым порогом чувствительности оказалось множество 10^7 молекул вирусных РНК-мишеней (рис. 4 и рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование LwCas13a для детекции патогенных микроорганизмов открывает большие перспективы. Методика, адаптированная в 2017 г. [7, 9] и названная SHERLOCK, основана на сочетании распознавания белком Cas13a молекул РНК, полученных в результате предварительной амплификации с использованием рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) и T7-транскрипции. Все реакции проходят в одной смеси. Используя такой подход, исследователи создали платформу для диагностики вируса Зика, обладающую аттомолярной чувствительностью и специфичностью, не уступающую количественной ПЦР (qПЦР) и цифровой каплевой ПЦР. В первую очередь ученые исследовали ортологи белка Cas13a, для получения надежного флуоресцентного сигнала при активации РНКазной активности белка Cas13a. Cas13a *Leptotrichia wadei*, способен детектировать до 50 пМ РНК-мишени [7]. Именно этот фермент был взят за основу при разработке платформы SHERLOCK. Несмотря на высокую чувствительность, авторы исследовали возможность совмещения Cas13a-детектирования с различными вариантами изотермической амплификации,

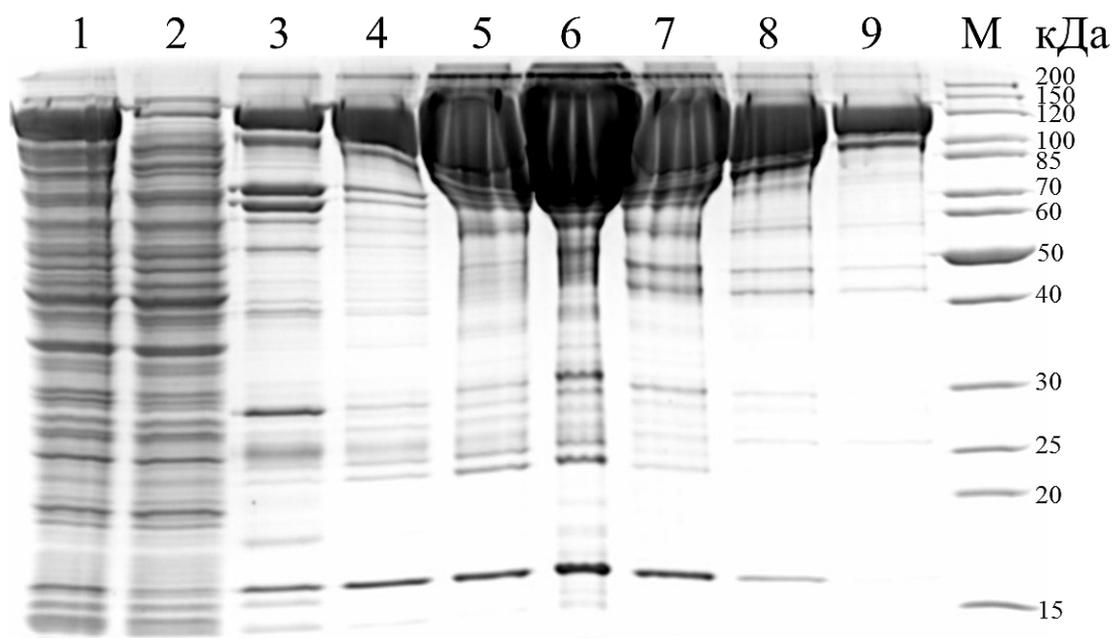


Рис. 1. Получение препарата рекомбинантного белка LwCas13a. Анализ фракций после аффинной хроматографии в системе денатурирующего электрофореза белков: 1 — клеточный лизат до хроматографии; 2 — белки не связавшиеся с хроматографическим носителем; 3–9 — фракции элюата; М — маркер молекулярного веса

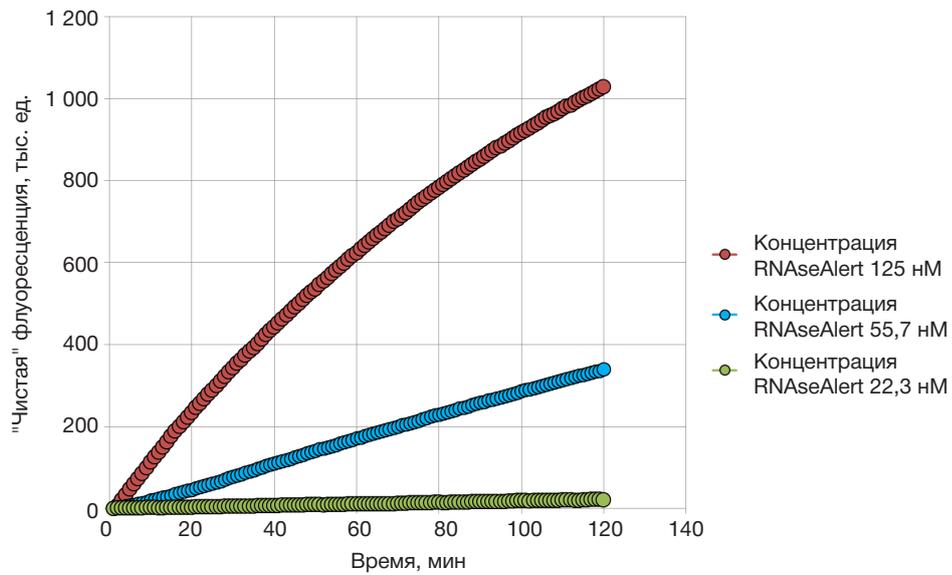


Рис. 2. Кинетика изменения сигнала флуоресценции при инкубировании различных концентраций RNaseAlert с РНКазой А

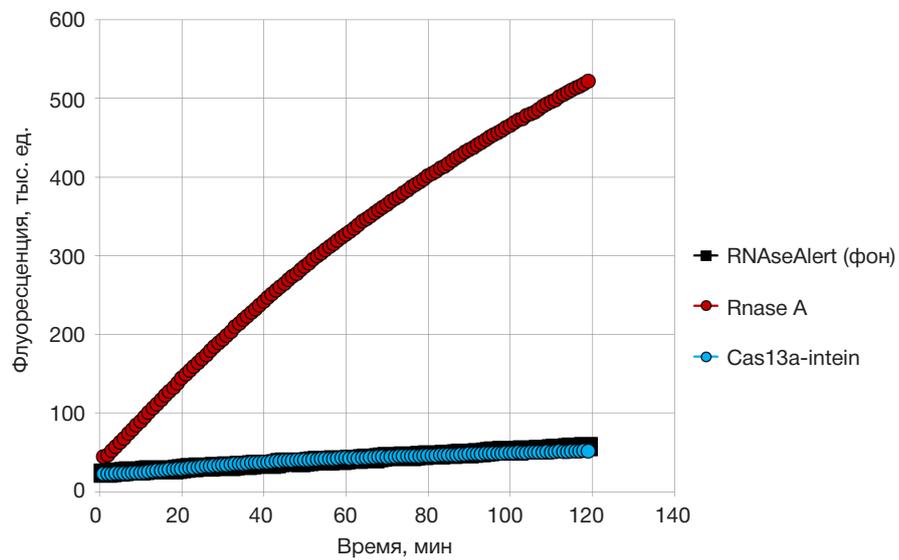


Рис. 3. Кинетика изменения сигнала флуоресценции при исследовании наличия сторонних РНКазных активностей препарата LwCas13a

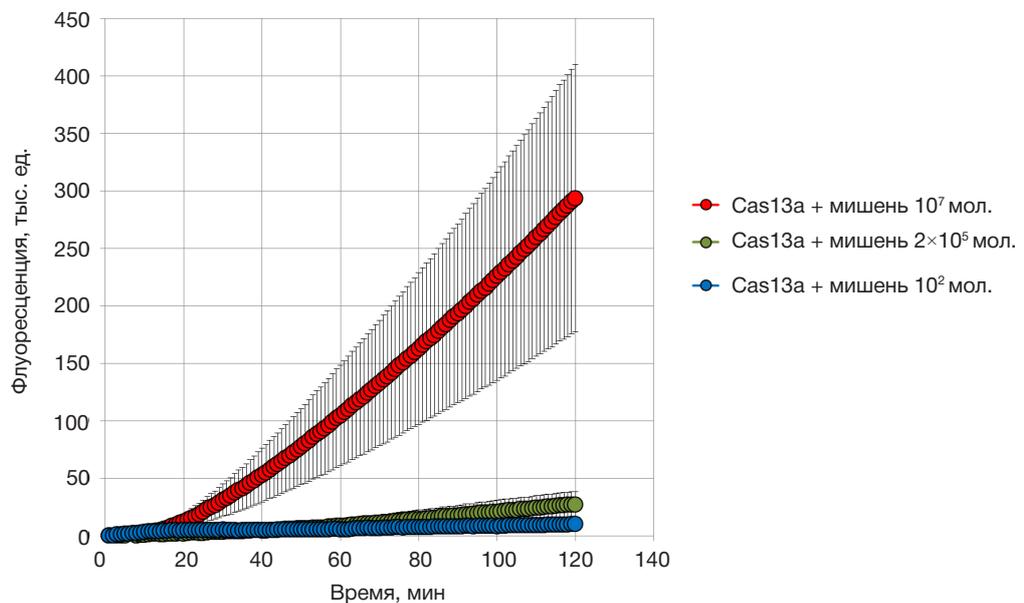


Рис. 4. Кинетика изменения сигнала флуоресценции при добавлении различных концентраций РНК-мишени

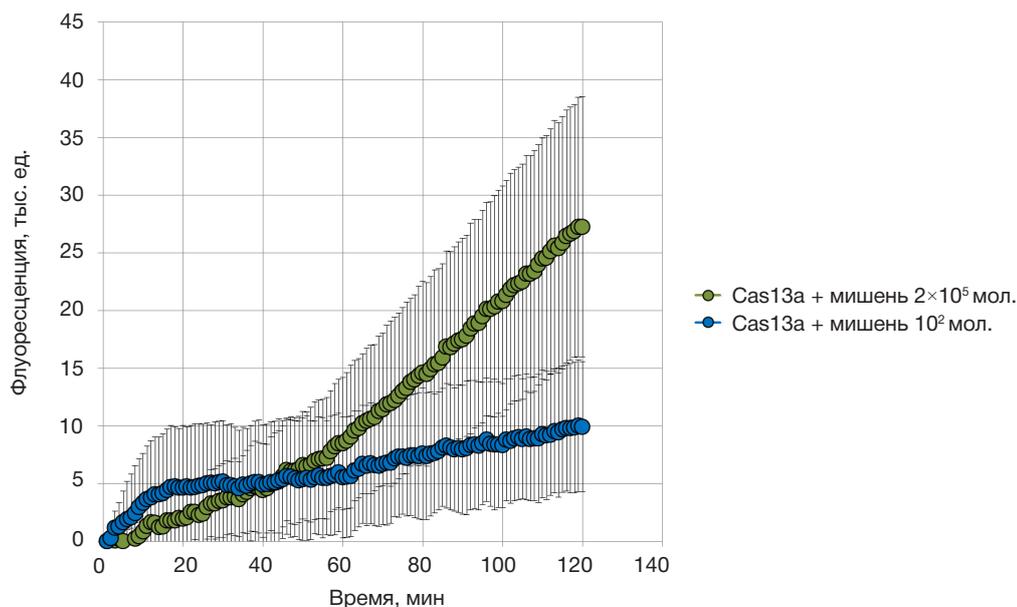


Рис. 5. Кинетика изменения сигнала флуоресценции при малых концентрациях РНК-мишени гриппа Б

и пришли к выводу, что RPA в сочетании с транскрипцией и РНКазной активностью белка Cas13a способна увеличить чувствительность метода. Было показано, что созданная платформа SHERLOCK способна различать РНК-мишени, отличающиеся друг от друга на один нуклеотид, при очень маленьких их концентрациях в растворе, а также может быть применима для портативного использования [7, 9].

В данной работе мы синтезировали вариант белка LwCas13a с оптимизированным кодоновым составом. В отличие от ранее описанного [7, 9], последовательность данного белка была изменена для его высокоэффективной продукции в клетках *E. coli*. Полученные штаммы-продуценты позволяют получать до 10 мг с 1 л культуры (рис. 1). Нами была разработана методика очистки Cas13a и проведены тесты, показывающие, что программируемая РНКаза не проявляет неспецифической РНКазной активности. Отсутствие последней свидетельствует о высокой чистоте полученного препарата. Далее мы отработали тесты по специфической *in vitro* детекции РНКазной активности белка Cas13a на основе фрагментов РНК вируса гриппа Б. Было показано, что без предварительной наработки мишени с использованием ранее описанных методик RPA и транскрипции с Т7-

полимеразой [7, 9] чувствительность детекции составляет 10^7 молекул.

ВЫВОДЫ

В рамках данной работы был синтезирован вариант белка Cas13a *Leptotrichia wadei* с оптимизированным кодоновым составом, позволяющий получать функционально активный препарат программируемой РНКазы в клетках *E. coli*. Показано, что полученный препарат белка обладает специфической РНКазной активностью, не проявляет сторонних видов нуклеазной активности и способен специфически определять мишень на примере фрагментов вируса гриппа Б. Дальнейшие исследования будут направлены на совершенствование метода: повышение его чувствительности, изучение специфичности программируемой РНКазы и повышение мультиплексности. Кроме того, будет предпринята попытка по созданию на основе Cas13a полевых диагностикумов. Применение полевых методов диагностики может существенно упростить контроль инфекционных агентов в переносчиках и окружающей среде, позволяя предотвратить попадание возбудителей инфекций в человеческую популяцию [13–15].

Литература

1. Makarov VV, Khromov AV, Gushchin VA, Tkachuk AP. Emergence Of New Infections In The 21st Century And Identification Of Pathogens Using Next Generation Sequencing. Bulletin of Russian State Medical University. 2017; 01: 5–25.
2. Fournier PE, Dubourg G, Raoult D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. Genome medicine. 2014; 6 (11): 114.
3. Karadeema RJ, Stancescu M, Steidl TP, Bertot SC, Kolpashchikov DM. The owl sensor: a 'fragile' DNA nanostructure for the analysis of single nucleotide variations. Nanoscale. 2018; 10: 10116–22.
4. Durmanov NN, Guliev RR, Eremenko AV, Boginskaya IA, Ryzhikov IA, Trifonova EA, et al. Non-labeled selective virus detection with novel SERS-active porous silver nanofilms fabricated by Electron Beam Physical Vapor Deposition. Sensors Actuators B: Chemical. 2018; 257: 37–47.
5. Pachauri V, Ingebrandt S. Biologically sensitive field-effect transistors: from ISFETs to NanofETs. Essays Biochemistry. 2016; 60 (1): 81–90.
6. Stein V, Alexandrov K. Synthetic protein switches: Design principles and applications. Trends in Biotechnology. 2015; 33 (2): 101–10.
7. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. Science. 2018; 360 (6387): 439–44.
8. East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, Burstein D, Cate JHD, Tjian R, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2

- enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*. 2016; 538 (7624): 270–73.
9. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017; 356 (6336): 435–42.
 10. Liu L, Li X, Wang J, Wang M, Chen P, Yin M, et al. Two Distant Catalytic Sites Are Responsible for C2c2 RNase Activities. *Cell*. 2017; 168 (1–2): 121–34.
 11. Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*. 1989; 182 (2): 319–26.
 12. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*. 1995; 4 (11): 2411–23.
 13. Li CX, Shi M, Tian JH, Lin XD, Kang YJ, Chen LJ, et al. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife*. 2015; 4: 1–26.
 14. Shi M, Lin XD, Tian JH, Chen LJ, Chen X, Li CX, et al. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*. 2016; 540 (7634): 539–43.
 15. Gao GF. Commentary From “ A ” IV to “ Z ” IKV: Attacks from Emerging and Re-emerging Pathogens. *Cell*. 2018; 172 (6): 1157–59.

References

1. Makarov VV, Khromov AV, Gushchin VA, Tkachuk AP. Emergence Of New Infections In The 21st Century And Identification Of Pathogens Using Next Generation Sequencing. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2017; 01: 5–25.
2. Fournier PE, Dubourg G, Raoult D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. *Genome medicine*. 2014; 6 (11): 114.
3. Karadeema RJ, Stancescu M, Steidl TP, Bertot SC, Kolpashchikov DM. The owl sensor: a 'fragile' DNA nanostructure for the analysis of single nucleotide variations. *Nanoscale*. 2018; 10: 10116–22.
4. Durmanov NN, Guliev RR, Eremenko AV, Boginskaya IA, Ryzhikov IA, Trifonova EA, et al. Non-labeled selective virus detection with novel SERS-active porous silver nanofilms fabricated by Electron Beam Physical Vapor Deposition. *Sensors Actuators B: Chemical*. 2018; 257: 37–47.
5. Pachauri V, Ingebrandt S. Biologically sensitive field-effect transistors: from ISFETs to NanoFETs. *Essays Biochemistry*. 2016; 60 (1): 81–90.
6. Stein V, Alexandrov K. Synthetic protein switches: Design principles and applications. *Trends in Biotechnology*. 2015; 33 (2): 101–10.
7. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*. 2018; 360 (6387): 439–44.
8. East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, Burstein D, Cate JHD, Tjian R, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*. 2016; 538 (7624): 270–73.
9. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017; 356 (6336): 435–42.
10. Liu L, Li X, Wang J, Wang M, Chen P, Yin M, et al. Two Distant Catalytic Sites Are Responsible for C2c2 RNase Activities. *Cell*. 2017; 168 (1–2): 121–34.
11. Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*. 1989; 182 (2): 319–26.
12. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*. 1995; 4 (11): 2411–23.
13. Li CX, Shi M, Tian JH, Lin XD, Kang YJ, Chen LJ, et al. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife*. 2015; 4: 1–26.
14. Shi M, Lin XD, Tian JH, Chen LJ, Chen X, Li CX, et al. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*. 2016; 540 (7634): 539–43.
15. Gao GF. Commentary From “ A ” IV to “ Z ” IKV: Attacks from Emerging and Re-emerging Pathogens. *Cell*. 2018; 172 (6): 1157–59.

ПОИСК И АНАЛИЗ CRISPR-CAS СИСТЕМЫ В ШТАММЕ *ESCHERICHIA COLI* HS И ДЕТЕКТИРУЕМЫХ СПЕЙСЕРАМИ ЕГО CRISPR-КАССЕТЫ ФАГОВЫХ РАС МЕТОДАМИ БИОИНФОРМАТИКИ

Е. И. Иванова¹✉, Ю. П. Джиоев², А. Ю. Борисенко², Н. П. Перетолчина², Л. А. Степаненко², А. И. Парамонов¹, Е. В. Григорова¹, У. М. Немченко¹, Т. В. Туник¹, Е. А. Кунгурцева¹

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск

² Институт биомедицинских технологий, Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск

CRISPR-Cas система — это иммунная система прокариот, обеспечивающая защиту от чужеродных репликонов, в первую очередь вирусов и плазмид. Устойчивость к повторным инфекциям приобретает в результате включения в состав CRISPR-кассет коротких последовательностей, или спейсеров, комплементарных участкам соответствующих вирусных или плазмидных геномов. В настоящее время эшерихиозные инфекции остаются серьезной проблемой практической медицины. Вследствие их крайней устойчивости к терапии с использованием антибиотиков необходима разработка новых подходов лечения. Целью исследования был поиск структур CRISPR-Cas систем в геномной последовательности штамма *Escherichia coli* HS. Использовали методы программного моделирования MacSyFinder (Macromolecular System Finder, ver. 1.0.2.). Поиск точной гомологии последовательностей осуществляли посредством установленных вспомогательных пакетов makeblastdb (ver. 2.2.28), HMMER (ver. 3.0). В результате методами биоинформатики была выявлена одна CRISPR-Cas система и расшифрованы спейсерные последовательности CRISPR-кассеты у штамма *Escherichia coli* HS. С помощью последовательностей спейсеров CRISPR-кассеты были определены комплементарные им протоспейсерные участки нескольких типов фагов, что позволяет оценить степень их устойчивости к этим чужеродным генетическим элементам.

Ключевые слова: биоинформатика, CRISPR-Cas система, *Escherichia coli* HS, бактериофаги

✉ **Для корреспонденции:** Елена Иннокентьевна Иванова
ул. Тимирязева, д. 16, г. Иркутск, 664003; ivanova.iem@gmail.com

Статья получена: 15.03.18 **Статья принята к печати:** 24.03.18

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.019

THE SEARCH AND ANALYSIS OF A CRISPR-CAS SYSTEM IN *ESCHERICHIA COLI* HS WITH SUBSEQUENT SCANNING FOR THE CORRESPONDING PHAGE RACES BASED ON THE SPACERS OF THE DETECTED CRISPR ARRAY USING BIOINFORMATIC METHODS

Ivanova EI¹✉, Dzhioev YuP², Borisenko AY², Peretolchina NP², Stepanenko LA², Paramonov AI¹, Grigorova EV¹, Nemchenko UM¹, Tunik TV¹, Kungurtseva EA¹

¹ Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk

² Research Institute for Biomedical Technologies of Irkutsk State Medical University, Irkutsk

CRISPR-Cas is an immune system of prokaryotes that protects them against alien replicons, mainly viruses and plasmids. Short sequences (spacers) complementary to the regions of a viral or plasmid genome are inserted into a CRISPR array conferring resistance to reinfection. Infections caused by *Escherichia coli* still present a serious challenge for clinical medicine. The aim of this study was to scan the genome of *Escherichia coli* HS for CRISPR-Cas components. The search was conducted using MacSyFinder (Macromolecular System Finder, ver. 1.0.2.), a program for bioinformatic modelling. Sequence homology searches were done using makeblastdb (ver. 2.2.28) and HMMER (ver. 3.0) tools. Bioinformatics-based methods allowed us to detect one CRISPR-Cas system in the studied genome of *Escherichia coli* HS and read the spacer sequences of its CRISPR array. The protospacer regions complementary to the spacer sequences of the detected CRISPR array are typical for a few types of phages. Based on these findings, one can assess the degree of bacterial resistance to alien genetic elements.

Keywords: bioinformatics, CRISPR-Cas system, *Escherichia coli* HS, bacteriophage

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena Ivanova
Timiryazeva 16, Irkutsk, 664003; ivanova.iem@gmail.com

Received: 15.03.18 **Accepted:** 24.03.18

DOI: 10.24075/brsmu.2018.019

Escherichia coli — это вид, состоящий из многих биотипов. Представители некоторых из них являются комменсальными колонизаторами кишечного биотопа млекопитающих (в том числе человека), другие вызывают различные типы заболеваний. Среди патогенных возбудителей кишечных инфекций, важную роль играет энтерогеморрагическая

кишечная палочка *Escherichia coli* O157:H7, а среди комменсальных выделяются представители биотипа *E. coli* HS. Вызванная штаммами *E. coli* O157:H7 инфекция может привести к развитию гемолитико-уремического синдрома (ГУС) с формированием почечной недостаточности. *E. coli* O157:H7 — это один из серотипов, способных

продуцировать шига-токсины [1–3]. Лечения с доказанной эффективностью не существует, и во время острой фазы заболевания рекомендуется исключительно поддерживающая терапия. Полного согласия по вопросу о необходимости применения антибиотиков для лечения инфекции, вызванной шига-токсин-продуцирующими *E. coli* (Stx-*E. coli*), до сих пор не достигнуто [4, 5]. Показано, что антибиотикотерапия на стадии гастроинтестинальной инфекции Stx-*E. coli* повышает (приблизительно в 17 раз) риск развития развернутой картины ГУС [6]. Был сделан вывод о том, что повреждение мембраны бактерий, индуцируемое антибиотиками, может способствовать развитию острой стадии заболевания из-за выделения токсины в больших количествах [7].

В связи с этим необходима разработка альтернативных антибиотикам подходов борьбы с бактериальными патогенами, среди которых вновь становится актуальной фаговая терапия [8–10]. Для развития этого направления необходимы фундаментальные знания генетической природы взаимоотношений между бактериями и фагами, что требует наличия у исследователя их геномных структур и новых методов их анализа. На сегодняшний день уже применяются компьютерные программные методы биоинформатики, позволяющие оперировать большими массивами геномных данных и получать новую информацию о генетической природе бактерий [11].

Кроме развития методов биоинформатики значительным событием за последние несколько лет стало открытие специфической адаптивной защитной системы у прокариот. Длительное время считалось, что бактерии беззащитны в отношении бактериофагов, но еще в 1987 г. в геноме *E. coli* был обнаружен странный участок, состоящий из многочисленных повторов [12]. Лишь в 2005 г. стало известно, что разделяющие эти повторы промежуточные последовательности зачастую бывают идентичными последовательностям, найденным в геномах бактериофагов и плазмид [13, 14]. Обнаруженная структура, называемая CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats — CRISPR-associated proteins, или короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами с CRISPR-ассоциированными белками), является специфической адаптивной защитной системой бактерий и архей от чужеродного генетического материала (в большинстве случаев от фагов и плазмид) [15–18]. CRISPR-касеты представляют собой набор палиндромных повторов длиной 21–47 пар нуклеотидов (п.н.), разделенных уникальными спейсерными сайтами. Спейсеры комплементарно соответствуют участкам генов фагов и плазмид, к которым бактерия демонстрирует устойчивость [13]. В непосредственной близости от CRISPR-локуса находятся *cas*-гены, продукты которых обеспечивают функционирование CRISPR-локусов. На сегодняшний день выделяют 3 типа CRISPR-Cas систем, различающихся по механизму действия и *cas*-генам, представленным в геноме [19].

Использование методов биоинформатики позволяет обнаруживать и определять CRISPR-Cas системы в геномах бактерий [20, 21]. Так, тестирование фаговых рас через структуры спейсеров с помощью биоинформационных программных методов помогает в короткие сроки определить степень устойчивости бактерий к специфичным фагам и плазмидам [22–24]. Исследования в этом направлении крайне актуальны как для решения практических задач терапии инфекционных заболеваний, так и для изучения внутривидовых и межвидовых

эволюционных процессов у бактерий [17, 22]. Однако для многих видов бактерий механизм взаимоотношений между бактериями и фагами посредством их CRISPR-Cas систем и анти-CRISPR-Cas систем соответственно остается совершенно неизученным. Поэтому на первом этапе исследований необходима разработка эффективного алгоритма биоинформационных методов поиска и анализа локусов и структур CRISPR-Cas систем в геномах бактерий и последующего скрининга фаговых рас, тестируемых через их CRISPR-касеты. Исходя из этого, целью данной работы был поиск и исследование сайтов CRISPR-Cas систем в геноме *Escherichia coli* HS и последующий скрининг фаговых рас через CRISPR-касеты бактерий посредством разработанного алгоритма поисковых методов биоинформатики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования послужил штамм *Escherichia coli* HS, два генома которого представлены в базе данных GenBank (№ NC_009800.1, секвенирован в 2017 г. и № CP000802, секвенирован в 2014 г.). Штамм *E. coli* HS, представленный геномом в базе данных GenBank под № NC_009800.1, был культивирован из эталонного штамма коллекции Центра разработки вакцин (США) [25]. Для поиска CRISPR-Cas систем нами была использована последовательность генома эталонного штамма под № CP000802 [26]. Данный штамм был выделен от здорового человека, желудочно-кишечный тракт которого был колонизирован этим штаммом без каких-либо видимых клинических симптомов [25].

Для поиска сайтов CRISPR-Cas систем использовали методы программного моделирования MacSyFinder (Macromolecular System Finder, ver. 1.0.2.) [27]. Программа основана на поиске через белковый профиль геномных последовательностей, закодированных как скрытые марковские модели (СММ), которые доступны в базах данных: PFAM, TIGRFAM или PRODOM. Поиск точной гомологии последовательностей осуществляли при помощи установленных вспомогательных пакетов makeblastdb (ver. 2.2.28) и HMMER (ver. 3.0), а также выявлении структурных и функциональных характеристик обнаруженных *cas*-генов каждого анализируемого генома [28]. Визуализацию полученных результатов в MacSyFinder осуществляли через веб-интерфейс MacSyView. В качестве языка программирования использовали Python (ver. 2.7) [29]. Поиск расшифровки CRISPR-касет производили при помощи онлайн-приложения «CRISPR: a CRISPR Interactive database» на Gen Ouest Bioinformatics Platform (<http://genouest.org/>). Геномы бактерий и архей в приложении загружены из NCBI FTP Server и обработаны в программах C и Java (ver. 1.5.0.12.) [30]. Метод обнаружения данного приложения был основан на ограничении числа максимальных совпадений. Во избежание детекции ошибочных структур фактический минимальный процент идентичности, необходимый для обнаружения, был фиксирован и составлял 60%. Работу веб-страницы осуществляли с помощью PHP (ver. 4.3.9), Java (ver. 1.5.0.12). Идентифицировали фаги по расшифрованным спейсерным последовательностям с помощью алгоритма поиска BLASTn по базе данных GenBank-Phage [31]. Были использованы онлайн-приложения: CRISPRTarget (http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html), Mycobacteriophage Database (<http://phagesdb.org/blast/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате поиска в геноме штамма *E. coli* HS (№ CP000802) был выявлен локус одной CRISPR-Cas системы в позиции 2920652-2921839 нуклеотидных оснований (н.о.), т. е. его размер составлял 1187 н.о. По структуре эта CRISPR-Cas система была отнесена к типу CAS-Type-IE.

При помощи программы MacSyFinder были обнаружены и визуализированы участки генома *E. coli* HS — гены, кодирующие Cas-белки:

- обязательные (mandatory), присутствие которых в геноме указывает на наличие CRISPR-Cas системы (рис. 1);
- дополнительные (accessory), соответствующие генам, которые могут быть найдены в нескольких системах и которые трудно идентифицировать с помощью одного профиля белка, но также указывающие на наличие CRISPR-Cas системы у бактерии.

При помощи MacSyFinder удалось не только обнаружить cas-гены в CRISPR-Cas системе анализируемого генома *E. coli* HS, но и визуализировать полученную информацию XML через MacSyView. Пример обнаруженных cas-генов и их расположение в геноме данного штамма представлен на рис. 1.

При помощи программных пакетов HMMER (ver. 3.0) и makeblastdb (ver. 2.2.28) у обнаруженных cas-генов в каждом

анализируемом геноме, были получены структурные и функциональные характеристики: gene (профиль), system (система, к которой принадлежит ген), hitid (идентификатор), hit seq length (длина последовательности совпадения), replicon name (имя репликона), position hit (позиция во входном файле), i-eval ("независимый Evaluate"), score (оценка hit), profile coverage (процент профиля, который соответствует последовательности hit), sequence coverage (процент от последовательности hit, который соответствует профилю), begin match (начало совпадения с профилем в последовательности), end match (конец совпадения с профилем в последовательности) (рис. 2).

Расшифровку структур CRISPR-касset осуществляют в режиме реального времени при помощи онлайн-приложения «CRISPI: a CRISPR Interactive database», основанного главным образом на гомологии повторяющихся участков. В результате в CRISPR-касsetе исследуемого штамма было идентифицировано 11 повторяющихся (repeat) последовательностей, консенсусная схема которых представлена на рис. 3. После обнаружения повторов в приложении «CRISPI: a CRISPR Interactive database» удалось расшифровать в CRISPR-касsetе 10 «спейсерных» (spacer) структур (табл. 1). При помощи Java были визуализированы CRISPR-касsetа и cas-гены в геноме бактерии (рис. 4).

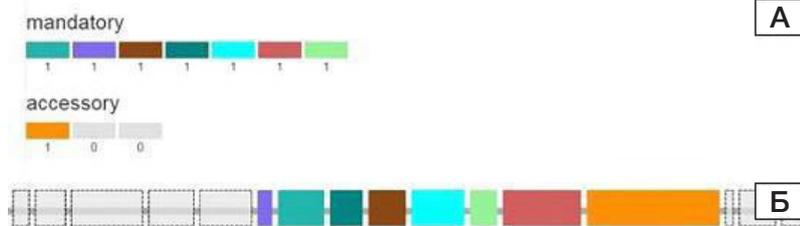


Рис. 1. Cas-гены (А) и их расположение в геноме (Б) *E. coli* HS (№ CP000802), обнаруженные при помощи MacSyFinder и визуализированные через MacSyView

Color	Sequence Id	Position	Profile Match	Function	Gene status	System	Protein length (aa)	Score	i-value	Profile coverage	Sequence coverage	Begin match	End match
Blue	kl NC_002695.1_prot_NP_311635.1_3467	3467	cas2_TypeIE	cas2_TypeIE	mandatory	CAS-TypeIE	97	133.6	5.5e-40	1.00	0.89	3	88
Green	kl NC_002695.1_prot_NP_311636.1_3468	3468	cas1_TypeIE	cas1_TypeIE	mandatory	CAS-TypeIE	307	380.1	1.4e-114	0.99	0.86	8	272
Red	kl NC_002695.1_prot_NP_311637.1_3469	3469	cas6_TypeIE	cas6_TypeIE	mandatory	CAS-TypeIE	216	292.6	7e-88	1.00	0.98	1	212
Orange	kl NC_002695.1_prot_NP_311638.1_3470	3470	cas5_TypeIE	cas5_TypeIE	mandatory	CAS-TypeIE	248	159.4	3e-47	0.99	0.93	3	233
Purple	kl NC_002695.1_prot_NP_311639.1_3471	3471	cas7_TypeIE	cas7_TypeIE	mandatory	CAS-TypeIE	351	447.9	9.3e-135	1.00	0.92	3	324
Light Green	kl NC_002695.1_prot_NP_311640.1_3472	3472	cse2_TypeIE	cse2_TypeIE	mandatory	CAS-TypeIE	178	127.7	1.3e-37	1.00	0.89	12	169
Light Red	kl NC_002695.1_prot_NP_311641.1_3473	3473	cse1_TypeIE	cse1_TypeIE	mandatory	CAS-TypeIE	520	620.3	7.7e-187	1.00	0.97	5	509
Light Orange	kl NC_002695.1_prot_NP_311642.1_3474	3474	cas3_TypeI	cas3_TypeI	accessory	CAS	885	216.2	1.9e-64	0.90	0.42	292	662

Рис. 2. Структурные и функциональные характеристики белков Cas *E. coli* HS (№ CP000802), обнаруженные при помощи MacSyFinder

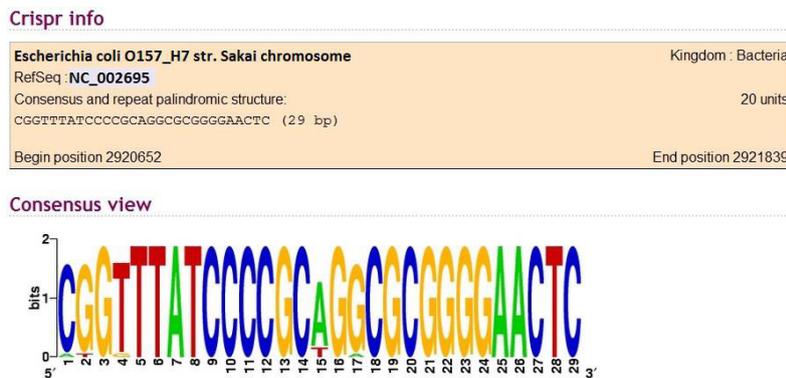


Рис. 3. Консенсусная схема чередующихся повторов в геноме штамма *E. coli* HS (№ CP000802), полученных при помощи приложения «CRISPI: a CRISPR Interactive database». Размер нуклеотидных символов свидетельствует о величине варибельности нуклеотида в последовательности повтора — чем меньше его высота, тем он более изменчив

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В прошлом году в базе данных GenBank был задокументирован геном штамма *Escherichia coli* HS (№ NC_009800.1) и появилась информация о наличии в его геноме трех локусов CRISPR-Cas систем. В базе данных CRISPR-Cas систем (<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/crispr/>) эти локусы представлены в нескольких вариантах. Структуры CRISPR-кассеты, полученные

в нашем исследовании генома штамма *E. coli* HS (№ CP000802, секвенирован в 2014 г.) в основном совпадали со структурами штамма *E. coli* HS (вариант NC_009800_6, секвенирован в 2017 г.).

В ходе работы была проведена идентификация фагов по расшифрованным спейсерным последовательностям, выявленным в CRISPR-кассете этого штамма (табл. 2). Из 10 спейсерных последовательностей только 4 спейсера (1, 5, 7, 10) комплементарно связались с протоспейсерными

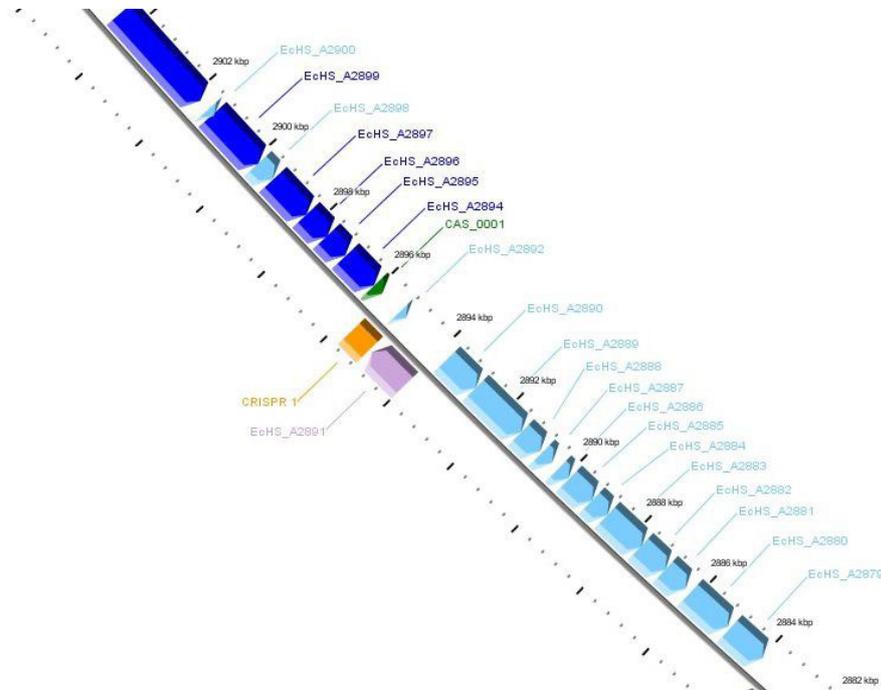


Рис. 4. Расположение cas-генов и CRISPR-кассеты в геноме штамма *E. coli* HS (№ CP000802)

Таблица 1. Список последовательностей в CRISPR-кассете: спейсерные участки (spacer) разделенные повторами (repeat-unit), обнаруженные при помощи «CRISPI: a CRISPR Interactive database» в геноме штамма *E. coli* HS (№ CP000802)

Спейсеры/повторы	Начало	Конец	Нуклеотидные последовательности	Размер
unit 1	2920652	2920680	ATGGTTATCCCCGCTGACGCGGGGAATC	29
spacer 1	2920681	2920712	TCGTCCAGACTGAATACGTTGTCCTAAAATCT	31
unit 2	2920713	2920741	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAATC	29
spacer 2	2920742	2920773	CTATTGATGAGGTGCACCATCAGAAGCGAGAT	31
unit 3	2920774	2920802	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAATC	29
spacer 3	2920803	2920834	GACGTACAGATTGGCTGCGGCACCTCAAACAC	31
unit 4	2920835	2920863	CGGTTTATCCCCGAGCGCGGGGAATC	29
spacer 4	2920864	2920895	TTAATTCGCGTACCTGCGCATCCATTGCCGCG	31
unit 5	2920896	2920924	CGGTTTATCCCCGAGCGCGGGGAATC	28
spacer 5	2920925	2920956	CGCAATCATGTTTTTCATTGGGTTTACGTCTT	31
unit 6	2920957	2920985	CGGTTTATCCCCGAGCGCGGGGAATC	28
spacer 6	2920986	2921017	TTTTTATGACTGAATCCACTACGCCTTCATAG	31
unit 7	2921018	2921046	CGGTTTATCCCCGAGCGCGGGGAATC	28
spacer 7	2921047	2921078	TTTACGTCGTTGATGACATCGTTCAGGTGTTT	31
unit 8	2921079	2921107	CGGTTTATCCCCGAGCGCGGGGAATC	28
spacer 8	2921108	2921139	GTGATTTTCGTACCCGGCGGATCGCGATATG	31
unit 9	2921140	2921168	CGGTTTATCCCCGAGCGCGGGGAATC	28
spacer 9	2921169	2921200	GATAACCGCTTCGCGGTCAATATCTGCCGCAC	31
unit 10	2921201	2921229	CGGTTTATCCCCGAGCGCGGGGAATC	28
spacer 10	2921230	2921261	GCCCATCGCTGCGCCACTGTTAAAAAGTT	31
unit 11	2921262	2921290	CGGTTTATCCCCGAGCGCGGGGAATC	28
spacer 11	2921291	2921322	TCATTGCAATCATCCACTGACTCAGGGGCTG	31

Таблица 2. Спект фаговых рас, выявленных по комплементарным структурам спейсерных последовательностей CRISPR-кассеты штамма *E. coli* HS (№ CP000802)

№	Спейсер	Бактериофаги	Количество замен
1	спейсер 1 (2920681-2920712)	<i>Aeromonas phage phiAS4</i> , (HM452125) положение: 100313-100337, <i>Cronobacter phage vB_CsaP_Ss1</i> , (KM058087) положение: 19880-19863	8 10
2	спейсер 5 (2920925-2920956)	<i>Salmonella phage PVP-SE1</i> , (GU070616) положение: 124932-124959 <i>Salmonella phage SSE-121</i> , (JX181824) положение: 87806-87779 <i>Bacillus phage Bp8p-T</i> , (KJ010548) положение: 144792-144820 <i>Bacillus phage Bp8p-C</i> , (KJ010547) положение: 144790-144818	7 7 8 8
3	спейсер 7 (2921047-2921078)	<i>Rhizobium phage vB_RleM_P10VF</i> , (KM199770) положение: 93101-93076 <i>Burkholderia phage phiE255</i> , (CP000622) положение: 17180-17211 <i>Burkholderia cenocepacia phage BcepMu</i> , (AY539836) положение: 30887-30918 <i>Gordonia phage GTE5</i> , (JF923796) положение: 49708-49734 <i>Dickeya phage vB_DsoM_LIMEstone1</i> (HE600015) положение: 52018-52038 <i>Dickeya phage RC-2014</i> , (KJ716335) положение: 27496-27516 <i>Synechococcus phage S-CAM1</i> (HQ634177) положение: 189041-189018 <i>Cyanophage S-SSM6b</i> (HQ316603) положение: 161353-161374 <i>Cyanophage S-SSM4</i> (HQ316583) положение: 103276-103255	8 7 7 8 8 8 9 10 10
4	спейсер 10 (2921230-2921261)	<i>Bacteriophage RTP</i> , (AM156909) положение: 34535-34554	10

структурами фаговых рас, представленными в данной таблице. Выявленные фаговые расы характерны для широкого круга разнообразных бактериальных хозяев. Возможно, это следствие горизонтального переноса CRISPR-Cas систем между типами бактерий за длительный период формирования и развития у них «адаптивной иммунной системы». Необходимы дальнейшие исследования, в ходе которых будут получены новые фундаментальные знания о природе антагонистических взаимоотношений между бактериями и фагами. По детектируемым фаговым расам можно судить о степени защищенности и живучести бактерий в период эволюционного развития.

ВЫВОДЫ

Проведенные поиск и анализ расшифрованной структуры CRISPR-кассеты в геноме штамма *E. coli* HS (№ CP000802, секвенирован в 2014 г.) позволяют считать используемые биоинформационные программные методы поиска структур

CRISPR-Cas систем в расшифрованных геномах бактерий весьма эффективными, а результаты высоко информативными. Наличие Cas-белков, относящихся к категории mandatory, свидетельствует о высокой антифаговой активности CRISPR-Cas системы изученного штамма. Количество выявленных спейсеров свидетельствует о длительности его эволюционной истории. Сравнительный анализ структур спейсеров в двух CRISPR-кассетах, выявленных в геноме штамма *E. coli* HS (№ CP000802, секвенированного в 2014 г. и № NC_009800.1, секвенированного в 2017 г.), показывает, что количество спейсеров в CRISPR-кассете генома штамма № NC_009800.1 увеличилось до 19. При этом количество спейсеров в геноме штамма № CP000802 равно всего 10. Можно предположить, что такое увеличение количества спейсеров стало возможным за счет их накопления в процессах частого пассирования этого штамма либо вследствие большого числа случаев его контаминации фагами. В любом случае оно может свидетельствовать о высокой активности CRISPR-Cas системы штамма *E. coli* HS.

Литература

- Trachtman H, Austin C, Lewinski M, Stahl R. A. Renal and neurological involvement in typical Shiga toxin-associated HUS. *Nature Reviews Nephrology*. 2012; (8): 658–69.
- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013; (26): 822–80.
- Tarr G, Shringi S, Phipps AI, Besser TE, Mayer J, Oltean HN, et al. Geogenomic Segregation and Temporal Trends of Human Pathogenic *Escherichia coli* O157:H7, Washington, USA, 2005–2014. *Emerg Infect Dis*. 2018; 24 (1): 32–9.
- Ivanova EI, Rychkova LV, Nemchenko UM, Bukharova EV, Savelkaeva MV, Dzhioeva YuP. The Structure of the Intestinal Microbiota of the Intestine and the Frequency of Detection of Pathogenicity Genes (*stx1*, *stx2*, *bfp*) in *Escherichia coli* with Normal Enzymatic Activity Isolated from Children during the First Year of Life. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2017; 32 (1): 42–8.
- Holmes A, Dallman TJ, Shabaan S, Hanson M, Allison L. Validation of Whole-Genome Sequencing for Identification and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* To Produce Standardized Data To Enable Data Sharing. *J Clin Microbiol*. 2018; 56 (3): e01388-17.
- Wong CS, Mooney JC, Brandt JR, Staples AO, Jelacic S, Boster DR, et al. Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157:H7: a multivariable analysis. *Clin Infect Dis*. 2012; 55 (1): 33–41.
- Freedman SB, Xie J, Neufeld MS, Hamilton WL, Hartling L, Tarr PI. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, antibiotics, and risk of developing hemolytic uremic syndrome: A meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2016; (62): 1251–58.
- Pirnay JP, Blasdel BG, Bretaudeau L, Buckling A, Chanishvili N, Clark JR, et al. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm Res*. 2015; 32 (7): 2173–79.
- Qadir MI. Review: phage therapy: a modern tool to control bacterial infections. *Pak J Pharm Sci*. 2015; 28 (1): 265–70.
- Назаров П. А. Альтернативы антибиотикам: литические ферменты бактериофагов и фаговая терапия. *Вестник РГМУ*. 2018; (1).
- Rusconi B, Sanjar F, Koenig SS, Mammel MK, Tarr PI, Eppinger M. Whole Genome Sequencing for Genomics-Guided Investigations of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks. *Front Microbiol*. 2016; 7: 985.
- Nakata A, Amemura M, Makino KJ. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Bacteriol*. 1989; 171 (6): 3553–56.
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of

- extrachromosomal origin. *Microbiology* 2005; 151: 2551–61.
14. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJ, Snijders AP, et al. CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 2008; (321): 960–4.
 15. Джагаров Д. Э. Умные ножницы для ДНК. *Химия и жизнь*. 2014; (7): 6–9.
 16. Westra ER, Buckling A, Fineran PC. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2014; 12 (5): 317–26.
 17. Makarova KS, Koonin EV. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods Mol Biol*. 2015; (1311): 47–75.
 18. Modell JW, Jiang W, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems exploit viral DNA injection to establish and maintain adaptive immunity. *Nature*. 2017; 544 (7648): 101–4.
 19. Gasiunas G, Sinkunas T, Siksnys V. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014; 71 (3): 449–65.
 20. Peretolchina NP, Dzhioev YP, Borisenko AY, Paramonov AI, Voskresenskaya EA, Stepanenko LA, et al. Bioinformatic search and screening of phages and plasmids via spacer sites of *Yersinia pseudotuberculosis* YPIII CRISPR/Cas System. *Materials 15th Medical Biodefence Conference*, 26–29 April 2016; Minich: 43–44.
 21. Zlobin VI, Dzhioev YuP, Peretolchina NP, Borisenko AY, Stepanenko LA, Yingchen Wang, et al. Prospects to Enhance Phage Therapy by Looking At CRISP Fingerprints in Bacterial Populations. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*. 2018; 10 (5): 1–3.
 22. Abedon S, Kuhl S, Blasdel B. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011; (1): 66–85.
 23. Степаненко Л. А., Джиоев Ю. П., Борисенко А. Ю., Колбасеева О. В., Злобин В. И., Малов И. В. Поиск фагов и плазмид через спейсерные сайты CRISPR/CAS-системы *Neisseria meningitidis* fdaargos_214. *Журнал инфектологии*. 2018; 10 (S1): 30–31.
 24. Борисенко А. Ю., Джиоев Ю. П., Перетолчина Н. П., Степаненко Л. А., Кузьминова В. М., Колбасеева О. В. и др. Биоинформационный поиск и скрининг бактериофагов через спейсеры CRISPR/CAS-системы штамма *Staphylococcus aureus* Mu3. *Актуальные проблемы науки прибайкалья*. 2017; (2): 45–9.
 25. Levine M. M., Rennels M. B. *E. coli* colonization factor antigen in diarrhoea. *Lancet*. 1978; 2 (8088): 534.
 26. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GSA, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, et al. The Pangenome Structure of *Escherichia coli*: Comparative Genomic Analysis of *E. coli* Commensal and Pathogenic Isolates. *J Bacteriol*. 2008; 190 (20): 6881–93.
 27. Abby SS, Néron B, Ménager H, Touchon M, Rocha Eduardo PC. MacSyFinder: A Program to Mine Genomes for Molecular Systems with an Application to CRISPR-Cas Systems. *PLoS One*. 2014; 9 (10): e110726.
 28. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2013; 31: 397–405.
 29. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013; 152 (5): 1173–83.
 30. Grissa I, Vergnaud G, Poursel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res*. 2007; (35) (Web Server issue): W52–7.
 31. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *NCBI BLAST: a better web interface*. *Nucleic Acids Res*. 2008; (1); 36 (Web Server issue): W5–9.

References

1. Trachtman H, Austin C, Lewinski M, Stahl R. A. Renal and neurological involvement in typical Shiga toxin-associated HUS. *Nature Reviews Nephrology*. 2012; (8): 658–69.
2. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013; (26): 822–80.
3. Tarr G, Shringi S, Phipps AI, Besser TE, Mayer J, Oltean HN, et al. Geogenomic Segregation and Temporal Trends of Human Pathogenic *Escherichia coli* O157:H7, Washington, USA, 2005–2014. *Emerg Infect Dis*. 2018; 24 (1): 32–9.
4. Ivanova EI, Rychkova LV, Nemchenko UM, Bukharova EV, Savelkaeva MV, Dzhioeva YuP. The Structure of the Intestinal Microbiota of the Intestine and the Frequency of Detection of Pathogenicity Genes (*stx1*, *stx2*, *bfp*) in *Escherichia coli* with Normal Enzymatic Activity Isolated from Children during the First Year of Life. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2017; 32 (1): 42–8.
5. Holmes A, Dallman TJ, Shabaan S, Hanson M, Allison L. Validation of Whole-Genome Sequencing for Identification and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* To Produce Standardized Data To Enable Data Sharing. *J Clin Microbiol*. 2018; 56 (3): e01388–17.
6. Wong CS, Mooney JC, Brandt JR, Staples AO, Jelacic S, Boster DR, et al. Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157:H7: a multivariable analysis. *Clin Infect Dis*. 2012; 55 (1): 33–41.
7. Freedman SB, Xie J, Neufeld MS, Hamilton WL, Hartling L, Tarr PI. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, antibiotics, and risk of developing hemolytic uremic syndrome: A meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2016; (62): 1251–58.
8. Pirnay JP, Blasdel BG, Bretaudeau L, Buckling A, Chanishvili N, Clark JR, et al. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm Res*. 2015; 32 (7): 2173–79.
9. Qadir MI. Review: phage therapy: a modern tool to control bacterial infections. *Pak J Pharm Sci*. 2015; 28 (1): 265–70.
10. Nazarov PA. Аlтернативу антибиотикам: литические ферменты бактериофагов и фаговая терапия. *Vestnik RGMU*. 2018; (1).
11. Rusconi B, Sanjar F, Koenig SS, Mammel MK, Tarr PI, Eppinger M. Whole Genome Sequencing for Genomics-Guided Investigations of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks. *Front Microbiol*. 2016; 7: 985.
12. Nakata A, Amemura M, Makino KJ. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Bacteriol*. 1989; 171 (6): 3553–56.
13. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 2005; 151: 2551–61.
14. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJ, Snijders AP, et al. CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 2008; (321): 960–4.
15. Dzhagarov DJe. Умные ножницы для ДНК. *Химия и жизнь*. 2014; 7: 6–9.
16. Westra ER, Buckling A, Fineran PC. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2014; 12 (5): 317–26.
17. Makarova KS, Koonin EV. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods Mol Biol*. 2015; (1311): 47–75.
18. Modell JW, Jiang W, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems exploit viral DNA injection to establish and maintain adaptive immunity. *Nature*. 2017; 544 (7648): 101–4.
19. Gasiunas G, Sinkunas T, Siksnys V. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014; 71 (3): 449–65.
20. Peretolchina NP, Dzhioev YP, Borisenko AY, Paramonov AI, Voskresenskaya EA, Stepanenko LA, et al. Bioinformatic search and screening of phages and plasmids via spacer sites of *Yersinia pseudotuberculosis* YPIII CRISPR/Cas System. *Materials 15th Medical Biodefence Conference*, 26–29 April 2016; Minich: 43–44.
21. Zlobin VI, Dzhioev YuP, Peretolchina NP, Borisenko AY, Stepanenko LA, Yingchen Wang, et al. Prospects to Enhance

- Phage Therapy by Looking At CRISP Fingerprints in Bacterial Populations. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*. 2018; 10 (5): 1–3.
22. Abedon S, Kuhl S, Blasdel B. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011; (1): 66–85.
 23. Stepanenko LA, Dzhioev JuP, Borisenko AJu, Kolbaseeva OV, Zlobin VI, Malov IV. Poisk fagov i plazmid cherez spejsernye sajty CRISPR/CAS-sistemy *Neisseria meningitidis* fdaargos_214. *Zhurnal infektologii*. 2018; 10 (S1): 30–31.
 24. Borisenko AJu, Dzhioev JuP, Peretolchina NP, Stepanenko LA, Kuz'minova VM, Kolbaseeva OV i dr. Bioinformacionnyj poisk i skringing bakteriofagov cherez spejsery CRISPR/CAS-sistemy shtamma *Staphylococcus aureus* Mu3. *Aktual'nye problemy nauki pribajkal'ja*. 2017; 2: 45–9.
 25. Levine M. M., Rennels M. B. *E. coli* colonization factor antigen in diarrhoea. *Lancet*. 1978; 2 (8088): 534.
 26. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GSA, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, et al. The Pangenome Structure of *Escherichia coli* Pathogenic Isolates. *J Bacteriol*. 2008; 190 (20): 6881–93.
 27. Abby SS, Néron B, Ménager H, Touchon M, Rocha Eduardo PC. MacSyFinder: A Program to Mine Genomes for Molecular Systems with an Application to CRISPR-Cas Systems. *PLoS One*. 2014; 9 (10): e110726.
 28. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2013; 31: 397–405.
 29. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013; 152 (5): 1173–83.
 30. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res*. 2007; (35) (Web Server issue): W52-7.
 31. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *NCBI BLAST: a better web Interface*. *Nucleic Acids Res*. 2008; (1); 36 (Web Server issue): W5-9.

КОНСЕРВАТИВНОСТЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ ПОМПЫ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ACrAB-TOLC *ESCHERICHIA COLI* КАК ПРИЗНАК ВОВЛЕЧЕННОСТИ В ПЕРМАНЕНТНУЮ «УБОРКУ» БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

М. В. Каракозова¹✉, П. А. Назаров²

¹ Медико-генетический научный центр, Москва

² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Помпы множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) помогают бактериям защищаться от неблагоприятного воздействия окружающей среды. Считается, что гены, кодирующие помпы МЛУ, вариабельны и относятся к так называемым генам «роскоши», т. е. предназначены для адаптации бактерий к изменению окружающих условий. Целью работы было проверить насколько консервативны последовательности генов помпы МЛУ. Для этого проводили анализ последовательностей белков AcrA, AcrB и TolC для различных лабораторных штаммов *Escherichia coli*. Методом выравнивания последовательностей было показано, что штаммы из разных стран, культивируемые в лабораториях уже долгое время, имеют удивительную консервативность последовательностей белков помпы AcrAB-TolC. Она напоминает консервативность генов «домашнего хозяйства», что, по-видимому, говорит о вовлеченности помпы МЛУ AcrAB-TolC в перманентную «уборку» клетки от различных веществ биотического и абиотического происхождения.

Ключевые слова: множественная лекарственная устойчивость, антибиотик, AcrAB-TolC, выравнивание последовательностей, *Escherichia coli*, помпа, транспортер, биоцид, гены «роскоши», гены «домашнего хозяйства»

Благодарности: авторы благодарят студентов (Джафарову Т., Мамедову Д., Маушева Ф., Мирanian К., Омарову Д. и Родионову Э.) и сотрудников кафедры морфологии и патологии Московского медицинского университета «Реавиз» за предварительные данные, их анализ и дискуссию.

✉ **Для корреспонденции:** Марина Викторовна Каракозова
Микрорайон 1-й, д. 15, кв. 43, г. Зарайск, Зарайский р-н, Московская обл., 140601; mvk752002@gmail.com

Статья получена: 19.02.2018 **Статья принята к печати:** 30.03.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.024

CONSERVED SEQUENCES OF GENES CODING FOR THE MULTIDRUG RESISTANCE PUMP ACrAB-TOLC OF *ESCHERICHIA COLI* SUGGEST THEIR INVOLVEMENT INTO PERMANENT CELL “CLEANING”

Karakozova MV¹✉, Nazarov PA²

¹ Research Centre of Medical Genetics, Moscow

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow

Multidrug resistance pumps (MDR pumps) of bacteria confer protection against aggressive environmental factors. The genes coding for MDR pumps are thought to be variable. They belong to the group of the so-called contingency genes, i.e. are necessary for bacterial adaptation to the changing environment. The aim of the present work was to establish how conserved are the sequences of genes coding for MDR pumps. We analyzed the sequences of AcrA, AcrB and TolC proteins of different *Escherichia coli* strains. Using sequence alignment tools, we demonstrated that strains originating in different countries and cultured in the labs for a long time are amazingly conserved in terms of AcrAB-TolC sequences. They resemble housekeeping genes, suggesting the involvement of the AcrAB-TolC pump into permanent “cleaning” of various biotic and abiotic agents.

Keywords: multidrug resistance, antibiotic, AcrAB-TolC, sequence alignment, *Escherichia coli*, pump, transporter, biocide, contingency genes, housekeeping genes

Acknowledgement: the authors wish to thank students (Dzhafarova T, Mamedova D, Maushev F, Miranian K, Omarova D and Rodionova E) and the Department of Morphology and Pathology of Medical Institute REAVIZ for the provided data, their analysis and discussion.

✉ **Correspondence should be addressed:** Marina Karakozova
Microrayon 1, d.15, kv. 43, Zaraisk, Zaraiski r-n, Moscow region, 140601; mvk752002@gmail.com

Received: 19.02.2018 **Accepted:** 30.03.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.024

Грамотрицательная гамма-протеобактерия *Escherichia coli* (*E. coli*) была впервые обнаружена в 1885 г. Теодором Эшерихом в стуле здоровых пациентов [1]. В природе *E. coli* распространена в нижнем отделе кишечника теплокровных организмов и служит важным объектом

научных исследований. В настоящее время четыре штамма *E. coli* (K-12, B, W и C) используют в качестве модельных организмов. Штамм K-12 был получен в 1922 г. сотрудниками Стэнфордского университета [2]. Штамм B описан в 1918 г. Д'Эрелем в Институте Пастера в Париже [3]. О двух других,

менее распространенных штаммах, сообщили в 1951 г. Маргарет Лейб (штамм С) [4, 5] и в 1943 г. Селман Ваксман (штамм W) [6]. Наиболее распространенные и известные штаммы принадлежат к группе K-12 и В. Лабораторные штаммы в ходе своей «эволюции» в условиях научных лабораторий оказались лишены ряда свойств, например образования биопленок на абиотических поверхностях, что сделало их удобным объектом для исследований, в том числе поиска антибиотиков [7]. Под действием комбинации естественного и искусственного отбора в лабораторных условиях были получены множественные производные штаммов K-12 и В, которые хорошо известны и используются исследователями повсеместно (табл. 1). Примерами производных штамма В могут служить известные штаммы BL21 и BL21(DE3), а штамма K-12 — DH5 α , JM109, W3110, XL-1 Blue, MG1655.

В настоящее время перед учеными стоит сложная задача поиска либо новых антибиотиков, либо эффективной их замены. Одно из наиболее перспективных направлений — выявление ингибиторов помп множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), отвечающих за активное удаление антибиотиков из бактериальной клетки. Данные, полученные на делеционных (нокаутных) мутантах, свидетельствуют: удаление генов, кодирующих помпы МЛУ может приводить к многократному снижению минимально действующей концентрации антибиотика [8], что имеет положительные аспекты в результате уменьшения как финансовых затрат на лечение пациента, так и токсичного действия антибиотикотерапии на организм. Хотя в настоящее время существует довольно много работ, посвященных исследованию влияния помп МЛУ на действие различных антибактериальных агентов, есть большой перечень объективных причин, которые не позволяют сравнивать данные, полученные в ходе исследований, друг с другом. К таким факторам можно отнести различный генетический фон штаммов, на которых проводилось исследование. Даже в случае близкородственных штаммов W3110 и MG1655 [9] существует более 200 различных модификаций генома, что затрудняет сравнение результатов. В силу того, что фактором, влияющим на резистентность, служит наличие или отсутствие определенной помпы, мы предположили, что для всех штаммов *E. coli* с идентичными последовательностями помпы МЛУ будет иметь место сопоставимая или равная резистентность. Для исследования выбрали помпу МЛУ AcrAB-TolC. Таким образом, целью работы было сравнение

последовательностей белков AcrA, AcrB и TolC у разных лабораторных штаммов *E. coli* и при наличии мутаций в них — изучение взаимосвязи между мутациями и резистентностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор объектов исследования

В качестве объектов исследования мы выбрали штаммы группы K-12: W3110, MG1655, NEB 5-alpha, MDS42, GM4792, AG100, MC4100, DH10B, ER3413, HMS174, BW2952, BW25113, и штамм группы В — BL21(DE3), чьи белковые последовательности генов *acrA*, *acrB*, *tolC* известны и депонированы (табл. 2).

Выбор референсной последовательности

При выборе референсной последовательности мы приняли во внимание наличие большого числа делеционных мутантов у штамм *E. coli* str. K-12 substrain BW25113. Штамм является базовым для коллекции делеционных мутантов Keio, включающей в себя штаммы с делециями 3985 генов из 4288 генов *E. coli* [10]. В качестве референсной последовательности AcrA выбрали последовательность AIN30961.1, референсной последовательности AcrB выбрали последовательность AIN30960.1 и референсной последовательности TolC — последовательность AIN33386.1.

Выравнивание последовательности

Анализ последовательностей осуществляли с использованием стандартных средств поиска локальных выравниваний NCBI BLASTp с функцией множественного сравнения [11], а также с использованием функции сравнения последовательностей программы STRING [12]. Визуализацию проводили с помощью программы NCBI MSA Viewer [13]. Последовательности каждого белка-компонента выравнивали относительно референсной последовательности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Известно, что бактериальная резистентность может являться результатом нескольких процессов: 1) накопления генов резистентности на плазидах; 2) увеличения уровня экспрессии генов, кодирующих помпы МЛУ; 3) дубликации

Таблица 1. Географическое происхождение геномов *E. coli*

Штамм	Организация	Город, страна
MG1655	University of Wisconsin	Милуоки, США
W3110	Nara Institute of Science and Technology	Икома, Япония
BL21(DE3)	Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology	Теджон, Южная Корея
MDS42	Osaka University	Осака, Япония
MC4100	University of Kiel, Germany	Киль, Германия
BW25113	Universite de Sherbrooke, Canada	Шербрук, Канада
ER3413	New England Biolabs	Ипсвич, США
AG100	University of Exeter	Эксетер, Великобритания
NEB 5-alpha	New England Biolabs	Ипсвич, США
HMS174	Austrian Centre of Industrial Biotechnology	Грац, Австрия
BW2952	Nankai University	Нанкай, Китай
DH10B	University of Wisconsin-Madison	Мадисон, США
GM4792	Beijing Normal University	Пекин, Китай

Таблица 2. Коды доступа (accession numbers) к депонированным белковым последовательностям генов *acrA*, *acrB* и *tolC*

Субштамм	Штамм	AcrA	AcrB	TolC
MG1655	K-12	NP_414996.1	NP_414995.1	NP_417507.2
W3110	K-12	BAE76242.1	BAE76241.1	BAE77091.1
NEB 5-alpha	K-12	AOO68785.1	AOO68784.1	AOO71261.1
MDS42	K-12	BAL37669.1	BAL37668.1	BAL39694.1
GM4792	K-12	AKK16793.1	AKK13611.1	AKK18828.1
AG100	K-12	CQR80062.1	CQR80061.1	CQR82466.1
MC4100	K-12	CDJ70932.1	CDJ70931.1	CDJ73817.1
DH10B	K-12	ACB01590.1	ACB01589.1	ACB04120.1
ER3413	K-12	AIZ54314.1	AIZ54313.1	AIZ52829.1
HMS174	K-12	CDY55568.1	CDY55565.1	CDY61615.1
BW2952	K-12	ACR63806.1	ACR63808.1	ACR65687.1
BW25113	K-12	AIN30961.1	AIN30960.1	AIN33386.1
BL21(DE3)	B	ACT42313.1	ACT42312.1	ACT44711.1

генов; 4) накопления мутаций [14, 15]. Изменение уровня экспрессии и накопление мутаций в генах, кодирующих помпы МЛУ, могут определяться точечными мутациями в аминокислотных последовательностях белков. Таким образом, изменение бактериальной резистентности может быть предсказано на основе анализа последовательностей.

Бактериальные гены подразделяются на гены «домашнего хозяйства» (*housekeeping genes*), обеспечивающие поддержание важнейших функций клетки и гены «роскоши» (*contingency genes*), которые играют важную роль в адаптации бактерий к изменяющимся условиям окружающей среды. Гены «домашнего хозяйства» обычно мутируют с низкой частотой, тогда как гены «роскоши» обладают высокой частотой мутации [16]. Считается, что гены помп МЛУ относятся к генам «роскоши», поэтому должны иметь довольно большую вариабельность первичной структуры белков, кодируемых ими. Так как лабораторные штаммы обычно подвержены давлению искусственного отбора, вызванного использованием различных биоцидов и мутагенов, можно предположить, что культивируемые на протяжении почти 100 лет штаммы и их производные, используемые в лабораториях различных стран, будут довольно сильно различаться по аминокислотному

полиморфизму. Сравнимые штаммы происходят из разных стран и континентов (табл. 1), поэтому можно предположить наличие мутаций в каком-либо из генов помпы МЛУ AcrB-TolC.

Однако проведенный нами анализ выравнивания последовательностей белков AcrA (рис. 1), AcrB (рис. 2) и TolC (рис. 3) субштамма BW25113 и последовательностей штамма K-12 (субштаммы W3110, MG1655, NEB 5-alpha, MDS42, GM4792, AG100, MC4100, DH10B, ER3413, HMS174, BW2952) и штамма B (субштамм BL21(DE3)), показал отсутствие полиморфизмов во всех трех белках помпы МЛУ AcrB-TolC, независимо от того, принадлежит субштамм к производному штамма K-12 или штамма B.

Принимая во внимание тот факт, что частота мутирования у *E. coli* составляет $\sim 1 \times 10^{-3}$ на геном за деление [17] а, по другой оценке, даже чуть выше ($3-4 \times 10^{-3}$ на геном за деление) [18], можно предположить, что последовательность помпы AcrB-TolC консервативна. Идентичность последовательностей составила 100% при одинаковой длине покрытия для каждого из исследуемых белков (397 аминокислотных остатков — для AcrA, 1049 аминокислотных остатков — для AcrB и 493 аминокислотных остатка — для TolC).

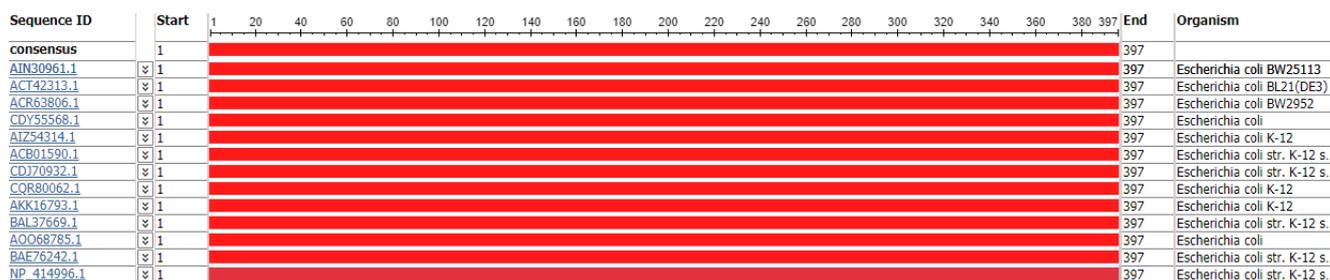


Рис. 1. Выравнивание последовательности белка AcrA субштамма BW25113 относительно последовательностей белка AcrA производных штаммов K-12 и B

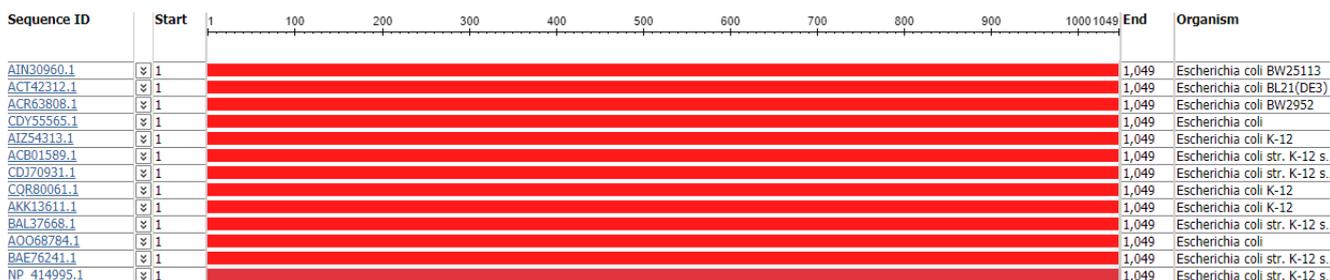


Рис. 2. Выравнивание последовательности белка AcrB субштамма BW25113 относительно последовательностей белка AcrB производных штаммов K-12 и B

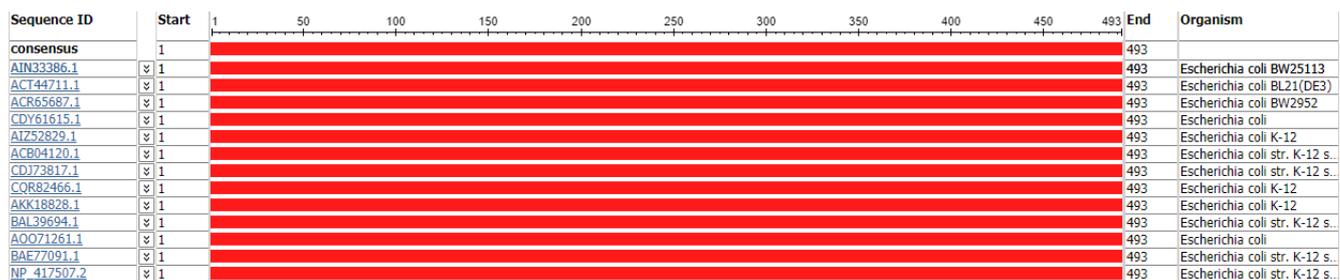


Рис. 3. Выравнивание последовательности белка TolC субштамма BW25113 относительно последовательностей белка TolC производных штаммов K-12 и B

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно современной классификации, штаммы группы В и К-12 относят к одной филогенетической группе А [19], что могло бы объяснить сходство аминокислотных последовательностей всех трех белков, однако не их идентичность. Из полученных нами результатов можно сделать вывод о наличии консенсусной последовательности очень консервативного ансамбля помпы МЛУ AcrAB-TolC. Таким образом, выбранные нами референсные последовательности белков AcrA (AIN30961.1), AcrB (AIN30960.1), и TolC (AIN33386.1) являются консенсусными для исследуемых штаммов *E. coli*.

Обнаруженные в работе последовательности будут являться консенсусными для представителей всей филогенетической группы А, а возможно и других филогенетических групп (В1, В2, D, и E), что может быть использовано в дальнейшем для нормирования исследованных последовательностей относительно консенсусной.

Отсутствие точечных мутаций в генах, кодирующих белки-компоненты помпы AcrAB-TolC, для всех исследуемых штаммов свидетельствует о жестком контроле отбора, как и в случае с генами «домашнего хозяйства». Такой контроль особенно важен для основной помпы МЛУ *E. coli* AcrAB-TolC, отвечающей за удаление различных веществ, таких как бензалкония хлорид, бромистый этидий, индол, гексан, антибиотики (эритромицин, ципрофлоксацин и т. д.),

родамин, берберин, а также трифенилфосфоний и его производные [20–21].

Необходимо отметить, что было бы неправильно рассматривать гены МЛУ только как гены, отвечающие за резистентность к биоцидам. Было показано их немаловажное значение в колонизации и персистенции бактерий [22], поэтому их роль не ограничена функцией защиты от антибактериальных агентов. По-видимому, продукты генов МЛУ выполняют рутинную работу по защите бактериальной клетки от различных веществ биотического и абиотического происхождения и заслуженно могут быть рассмотрены как своеобразные гены «домашнего хозяйства», занятые перманентной «уборкой», а не как гены «роскоши», включающиеся в работу только в определенный период времени.

ВЫВОДЫ

Полученные данные позволяют говорить об исключительной роли, которую выполняет в клетке *E. coli* помпа МЛУ AcrAB-TolC, последовательность белков которой оказалась неожиданно сверхконсервативной. Это позволяет рассматривать работу помпы МЛУ AcrAB-TolC под иным углом — как постоянную защиту бактериальной клетки от различных факторов окружающей среды; от работы помпы МЛУ зависит не только резистентность бактерии к антибиотикам и их альтернативам, но и само выживание бактерии.

Литература

- Escherich T. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglinge. Fortschr. Med. 1885; 3: 515–522.
- Daegelen P, Studier FW, Lenski RE, Cure S, Kim JF. Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3). J Mol Biol. 2009; 394 (4): 634–43.
- Bachmann BJ. Pedigrees of Some Mutant Strains of *Escherichia coli* K-12. Bacteriological Reviews, 1972; 36 (4): 525–557.
- Lieb M, Weigle JJ, Kellenberger E. A study of hybrids between two strains of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 1955; 69 (4): 468–471.
- Lieb M. Forward and Reverse Mutation in a Histidine-Requiring Strain of *Escherichia Coli* Genetics. 1951; 36 (5): 460–477.
- Archer CT, Kim JF, Jeong H, Park JH, Vickers CE, Lee SY, et al. The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. BMC Genomics. 2011; 12: 9.
- Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, Dorel C, Hooreman M, Lejeune P. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. J Bacteriol. 1998; 180 (9): 2442–2449.
- Sulavik MC, Houseweart C, Cramer C, Jiwani N, Murgolo N, Greene J, et al. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45 (4): 1126–1136.
- Hayashi K, Morooka N, Yamamoto Y, Fujita K, Isono K, Choi S, et al. Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. Mol Syst Biol. 2006; 2: 2006.0007.
- Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol Syst Biol. 2006; 2: 2006.0008.
- BLASTp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. Nucleic Acids Res. 2017; 45: D362–68.
- Multiple Sequence Alignment Viewer v. 1.7.7 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/msviewer/about/>)
- Nikaido H. Multidrug Resistance in Bacteria. Annu Rev Biochem. 2009; 78: 119–146.
- Martinez JL, Baquero F Mutation frequencies and antibiotic resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44 (7): 1771–1777.
- Moxon ER, Rainey PB, Nowak MA, Lenski RE. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. Curr Biol. 1994; 4: 24–33.
- Lee H, Popodi E, Tang H, Foster PL. Rate and molecular spectrum

of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012; 109 (41): E2774–E2783.

18. Drake JW. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 7160–7164.
19. Sims GE, Kim S.-H. Whole-genome phylogeny of *Escherichia coli*/Shigella group by feature frequency profiles (FFPs) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 (20): 8329–8334.

References

1. Escherich T. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglinge. *Fortschr. Med.* 1885; 3: 515–522.
2. Daegelen P, Studier FW, Lenski RE, Cure S, Kim JF. Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3). *J Mol Biol.* 2009; 394 (4): 634–43.
3. Bachmann BJ. Pedigrees of Some Mutant Strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriological Reviews*, 1972; 36 (4): 525–557.
4. Lieb M, Weigle JJ, Kellenberger E. A study of hybrids between two strains of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1955; 69 (4): 468–471.
5. Lieb M. Forward and Reverse Mutation in a Histidine-Requiring Strain of *Escherichia Coli* *Genetics*. 1951; 36 (5): 460–477.
6. Archer CT, Kim JF, Jeong H, Park JH, Vickers CE, Lee SY, et al. The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. *BMC Genomics*. 2011; 12: 9.
7. Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, Dorel C, Hooreman M, Lejeune P. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. *J Bacteriol.* 1998; 180 (9): 2442–2449.
8. Sulavik MC, Houseweart C, Cramer C, Jiwani N, Murgolo N, Greene J, et al. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45 (4): 1126–1136.
9. Hayashi K, Morooka N, Yamamoto Y, Fujita K, Isono K, Choi S, et al. Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol.* 2006; 2: 2006.0007.
10. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.* 2006; 2: 2006.0008.
11. BLASTp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
12. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45: D362–68.
13. Multiple Sequence Alignment Viewer v. 1.7.7 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/msaviewer/about/>)
14. Nikaido H. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78: 119–146.
15. Martinez JL, Baquero F Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44 (7): 1771–1777.
16. Moxon ER, Rainey PB, Nowak MA, Lenski RE. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr Biol.* 1994; 4: 24–33.
17. Lee H, Popodi E, Tang H, Foster PL. Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012; 109 (41): E2774–E2783.
18. Drake JW. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 7160–7164.
19. Sims GE, Kim S.-H. Whole-genome phylogeny of *Escherichia coli*/Shigella group by feature frequency profiles (FFPs) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 (20): 8329–8334.
20. Pos KM. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1794 (5): 782–793.
21. Nazarov PA, Osterman IA, Tokarchuk AV, Karakozova MV, Korshunova GA, Lyamzaev KG et al. Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 1394.
22. Piddock LJ Multidrug-resistance efflux pumps — not just for resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2006; 4 (8): 629–36.

ИЗМЕНЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА К ОНКОЛИТИЧЕСКИМ ЭНТЕРОВИРУСАМ ПРИ ПАССИРОВАНИИ В КУЛЬТУРЕ

А. В. Соболева^{1,2}, А. В. Липатова¹, Д. В. Кочетков¹, П. М. Чумаков^{1,2} ✉

¹ Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта, Москва

² Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова, Москва

Современная терапия мультиформных глиобластом не приводит к излечению пациентов. В качестве альтернативы перспективны онколитические вирусы (ОВ): они способны уничтожать опухолевые стволовые клетки, источники рецидивов. Однако каждый отдельный штамм ОВ эффективен только в ряде случаев. Для подбора подходящего штамма требуется тестирование чувствительности на живых опухолевых клетках пациента. Целью исследования было изучение изменения чувствительности к вирусам в процессе пассирования опухолевых клеток пациента в культуре. Органные и первичные культуры клеток глиобластом получали из операционного материала больных. Проводили сравнение чувствительности к четырем штаммам непатогенных энтеровирусов (вакцинный штамм полиовируса 1 типа, вирус Коксаки А7, Эховирусы 1 и 12) на первичных культурах, и на клетках, прошедших около 700 удвоений при пассировании. Чувствительность к вирусам оценивали по измерению доли жизнеспособных клеток с помощью МТТ теста через 72 ч после заражения серийными десятикратными разведениями вирусных препаратов. Клетки каждого из четырех пациентов имели строго индивидуальные спектры чувствительности к испытанным вирусным штаммам. Различия в минимальной инфекционной дозе, необходимой для заражения культур, составляли до 10⁵. При пассировании происходили изменения в чувствительности, которые могли приводить к повышению чувствительности к одному вирусу, и понижению — к другому. Различия в чувствительности коррелировали со способностью зараженных клеток продуцировать инфекционный вирус. На основании полученных данных можно заключить, что испытание индивидуальной чувствительности опухолевых клеток пациентов следует проводить на как можно более ранних этапах пассирования, предпочтительно — на первичных культурах.

Ключевые слова: онколитические вирусы, непатогенные энтеровирусы человека, мультиформная глиобластома, культура клеток, вирусная инфекция, чувствительность к вирусам, вирусный онколиз, виротерапия

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, уникальный код проекта RFMEFI60714X0014.

✉ **Для корреспонденции:** Петр Михайлович Чумаков
ул. Вавилова, д. 32, г. Москва, 119991; chumakovpm@yahoo.com

Статья получена: 16.06.2018 **Статья принята к печати:** 22.06.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.025

CHANGES IN THE SENSITIVITY OF HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS TO ONCOLYTIC ENTEROVIRUSES INDUCED BY PASSAGING

Soboleva AV^{1,2}, Lipatova AV¹, Kochetkov DV¹, Chumakov PM^{1,2} ✉

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow

² Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow

Existing therapies for glioblastoma multiforme do not ensure patient's recovery. Oncolytic viruses (OV) represent a promising alternative as they can destroy glioblastoma-initiating stem cells, the major cause of relapses. However, while individual OV strains are effective for some patients, they could be ineffective for others. To achieve a predictable therapeutic effect, live tumor cells of the patient need to be tested for their sensitivity to different viruses. The aim of this study was to assess how sensitivity of tumor cells to viruses changes with passaging in the cell culture. Primary glioblastoma cell cultures were prepared from excised tumors. We compared the sensitivity of the cells to four non-pathogenic enteroviruses (type 1 poliovirus, Coxsackie virus A7, Echoviruses 1 and 12) for freshly explanted primary tumor cell cultures and for those that had undergone 700 divisions during passaging. Cell sensitivity was assessed by the MTT assay based on the proportion of viable cells 72 hours after the cells were inoculated with serial 10-fold dilutions of virus preparations. Cells isolated from the tumors of 3 patients exhibited varying sensitivity to the used viral strains. Differences in the lowest virus dose required for the successful infection of the cell cultures were as high as 10⁵. Passaging induced sensitivity shifts, such as increased or decreased sensitivity to individual viruses. Differences in the sensitivity correlated with the ability of the infected cells to produce the virus. Based on our findings, we conclude that the sensitivity of cancer cells to viruses should be tested at very early stages of passaging, preferably in primary cultures.

Keywords: oncolytic viruses, non-pathogenic human enteroviruses, glioblastoma multiforme, cell culture, viral infection, sensitivity to viruses, viral oncolysis, virotherapy

Funding: this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Project ID RFMEFI60714X0014).

✉ **Correspondence should be addressed:** Peter M. Chumakov
Vavilova 32, Moscow, 119991; chumakovpm@yahoo.com

Received: 16.06.2018 **Accepted:** 22.06.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.025

Мультиформные глиобластомы — наиболее агрессивные опухоли головного мозга, для которых в настоящее время нет эффективной терапии, а средний период выживаемости пациентов после постановки диагноза и проводимого лечения составляет всего 15 месяцев [1, 2]. Трудности терапии глиобластом объясняются слабой проницаемостью через гематоэнцефалический барьер применяемых химиотерапевтических препаратов, а также способностью опухолевых стволовых клеток проникать вглубь здоровой ткани мозга и тем самым избегать хирургического удаления. В последнее время надежды на преодоление тупиковой ситуации с терапией глиобластом связывают с использованием онколитических вирусов. Описаны случаи успешного лечения и длительных многолетних ремиссий при их использовании [3–8]. Более того, установлена возможность уничтожения опухолевых стволовых клеток глиобластом под действием вирусов [9–14]. Однако несмотря на описанные случаи вирусной терапии глиобластом, применение онколитических вирусов оказывается эффективным только для части пациентов. Это связано с различиями молекулярно-генетических повреждений в клетках опухолей пациентов, влияющих на чувствительность к отдельным штаммам вирусов. Поэтому для достижения терапевтического эффекта целесообразно использование панелей онколитических вирусов, обладающих перекрывающимся спектром тропизма в отношении разных индивидуальных опухолевых клеток. Одним из подходов к более эффективному использованию вирусов может быть предварительное испытание индивидуальной чувствительности опухолевых клеток пациента к ряду препаратов онколитических вирусов с целью подбора наиболее эффективных вариантов. Для испытания необходимо получить жизнеспособные клетки из удаленного у пациента фрагмента опухоли и пассировать культуры клеток опухоли с целью установления причин их дифференциальной чувствительности к различным вирусам. Для отработки такого подхода мы провели оптимизацию процедуры получения живых клеток из глиобластом, их хранения в жизнеспособном состоянии в условиях глубокой заморозки, а также последующего пассирования в культуре клеток. Основной целью работы было определение, насколько клетки в культуре при их пассировании способны сохранять исходную чувствительность к испытываемому вирусу. В настоящем исследовании мы получили ряд культур клеток от пациентов и сравнили их ответ на заражение несколькими онколитическими энтеровирусами на различных стадиях, начиная от органной первичной культуры, и вплоть до десяти пассажей в культуре.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии клеток мультиформной глиобластомы

Клетки глиобластом U87MG и A172 из Американской коллекции клеточных культур (ATCC) выращивали в среде DMEM (ПанЭко, Москва) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина в атмосфере 5% CO₂ и при температуре 37 °С. Первичные органые культуры глиобластом приготавливали из свежих кусочков удаленных опухолей пациентов.

Получение органых и первичных культур глиобластом

Опухолевый материал получали в НИИ нейрохирургии имени Н. Н. Бурденко, согласно протоколу утвержденному

этическим комитетом организации. Образцы опухолевой ткани забирали в стерильные пробирки заполненные питательной средой DMEM и хранили при +4 °С не более суток. Для получения органых культур кусочки опухоли промывали фосфатно-солевым буфером, помещали на стерильную чашку Петри и с помощью пинцета и скальпеля удаляли участки некроза и кровеносные сосуды. Для получения клеточной суспензии опухоли продавливали через одноразовые стерильные культуральные нейлоновые сетки с размером отверстий 50 микрон, промывали три раза центрифугированием при 800 g 5 мин, суспендировали в ростовой среде, аккуратно пипетировали до получения гомогенной взвеси частиц, содержащих отдельные клетки или их агрегаты. Для консервирования жизнеспособных органых культур при температуре жидкого азота суспензию частиц помещали в среду DMEM, содержащую 50% сыворотки и 7% диметилсульфоксида, разливали по 1 мл в криопробирки. Замораживание проводили в хорошо изолированном контейнере при температуре –80 °С в течение суток, после чего ампулы переносили в жидкий азот. Для получения первичных культур глиобластом после диспергирования и доведения до плотности 2×10^4 частиц в 1 мл ростовой среды DMEM-F12 (ПанЭко, Москва) с добавлением 10% ЭТС и антибиотиков производили высевание клеток на 6-см культуральные пластиковые чашки Петри и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ и температуре 37 °С. Каждые 3 суток проводили замену среды. Рост клеток отмечали два раза в неделю. После образования неплотного монослоя (через 6–15 суток) клетки либо консервировали в жидком азоте, как описано выше, либо пассировали далее.

Пассирование культур глиобластом

При посеве первичных культур образование устойчивого роста до достижения монослоя наблюдали приблизительно у трети культур. Остальные высеянные клетки прекращали деление, вероятно в связи с отсутствием необходимых условий. Для пассирования выросших культур монослои отмытых клеток обрабатывали раствором трипсина и сажали на новые чашки в соотношении 1:2–1:3. Пассирование продолжали в течение длительного времени, и на каждом пассаже часть клеток подвергали криоконсервированию.

Штаммы онколитических вирусов

В работе использовали непатогенные штаммы энтеровирусов человека: вакцинный штамм полиовируса 1 типа (Сэбин), вирусы Коксаки А7 (ЖЭВ8), Эховирусу 1 (ЖЭВ4) и Эховирус12 (ЖЭВ7) [4, 15]. Энтеровирусы наращивали в культуре клеток почки африканской зеленой обезьяны Vero путем заражения с множественностью менее 1 БОЕ/кл. и сбора вирусного урожая через 24 ч. Вирусные титры определяли методом конечных разведений на культурах клеток Vero.

Анализ жизнеспособности клеток после инфицирования вирусами

96-луночные планшеты с клетками первичных и перевиваемых линий инфицировали 10-кратными серийными разведениями вирусов в диапазоне множественностей от 10⁻⁵ до 1 БОЕ/клетку, в четырех повторах. Адсорбцию вируса проводили в течение 1 ч, далее удаляли вирусосодержащую

жидкость, промывали фосфатно-солевым буфером и культивировали в ростовой среде с 2% ЭТС. Через 72 ч определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ теста, пользуясь набором реактивов CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Анализ вирусной репродукции в инфицированных клетках

Через 5 суток после заражения в планшетах выбирали лунки, где при минимальной дозе вируса наблюдался полный лизис клеток. После трех циклов замораживания–размораживания супернатанты осветляли центрифугированием (10 мин, 1000 g) и использовали для определения вирусного титра как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы измерили чувствительность к нескольким штаммам непатогенных энтеровирусов опухолевых клеток, полученных от трех больных и находящихся на различных уровнях пассирования в культуре. Было проведено сравнение первичных культур глиобластом, а также культур 6 пассажа. Время пассирования составляло около двух месяцев, за которые клетки в культурах успевали пройти около 700 делений. Для определения минимальной дозы вируса, необходимой для эффективного заражения, культуры

глиобластом инкубировали с серийными десятикратными разведениями стандартных вирусных препаратов и через 72 ч измеряли жизнеспособность клеток. На рис. 1А представлены профили чувствительности к четырем энтеровирусным штаммам первичных культур клеток, приготовленных из опухолей трех пациентов (обозначены как GM-3564-0, GM-3876-0 и GM-3912-0). В качестве контроля испытывали чувствительность к вирусным штаммам стандартной культуры клеток Vero, на которой эти вирусы регулярно пассируются. На рис. 1Б представлены результаты измерения чувствительности к тем же четырем вирусным штаммам культур клеток глиобластом, прошедших по 6 пассирований в культуре клеток (обозначены как GM-3564-6, GM-3876-6 и GM-3912-6). В качестве контроля также была использована линия Vero, чувствительность которой оценена в повторе (Vero-2).

Видно, что чувствительность к четырем штаммам энтеровирусов у трех первичных культур клеток глиобластом существенно различалась. Культура GM-3564 наиболее чувствительна к вирусу Коксаки А7 (инфицируется 10^{-6} -кратным разведением вирусного препарата), менее чувствительна к полиовирусу (инфицируется 10^{-4} -кратным разведением), и очень слабо чувствительна к Эховирусам 1 и 12 (инфицируется 10^{-3} -кратным разведением). Культура GM-3876 наиболее чувствительна к полиовирусу (инфицируется 10^{-6} -кратным разведением), далее — к вирусу Коксаки А7 (10^{-5} -кратное разведение), Эховирусу 12 (четвертое разведение) и Эховирусу 1 (третье разведение). Культура

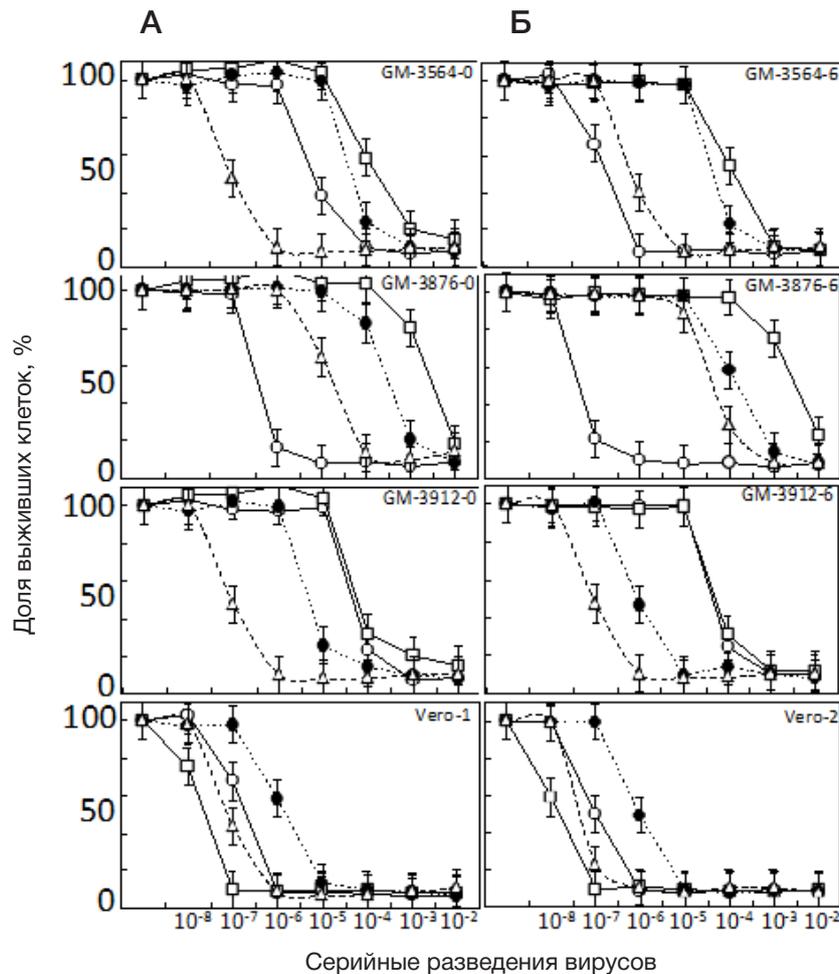


Рис. 1. Чувствительность культур первичных опухолевых клеток глиобластом, полученных от трех пациентов (А), и тех же клеток, прошедших 6 пассажей в культуре (Б), к четырем штаммам непатогенных онколитических энтеровирусов: —○— полиовирус 1 типа; —△— вирус Коксаки А7; —□— Эховирус 1; ...●... — Эховирус 12. Горизонтальная ось: 10^{-8} – 10^{-2} — десятикратные разведения вирусных препаратов

Таблица 1. Инфекционные титры вирусов, продуцируемых первичными и пассированными культурами клеток глиобластом при заражении низкой множественностью (менее 0,001 инфекционных единиц на клетку)

Культура клеток	Полиовирус 1	Коксаки А7	Эховирус 1	Эховирус 12
GM3564-0	4×10^5	3×10^7	5×10^3	6×10^4
GM3564-6	2×10^7	1×10^7	6×10^3	4×10^4
GM3876-0	1×10^6	2×10^4	1×10^3	3×10^2
GM3876-6	1×10^7	8×10^3	2×10^3	4×10^2
GM3912-0	1×10^4	3×10^7	8×10^3	1×10^4
GM3912-6	1×10^4	4×10^7	8×10^3	8×10^5
Vero-1	5×10^7	8×10^7	2×10^8	5×10^6
Vero-2	4×10^7	1×10^8	1×10^8	5×10^6

GM-3912 наиболее чувствительна к вирусу Коксаки А7 (седьмое разведение), далее к полиовирусу (пятое разведение) и Эховирусам 1 и 12 (четвертое разведение). Испытание вирусных препаратов на культуре Vero указывает на наибольшую активность Эховируса 1 (седьмое разведение), далее — полиовируса и вируса Коксаки А7 (шестое разведение) и Эховируса 12 (пятое разведение). Видно, что в результате пассирования произошли качественные изменения чувствительности клеток глиобластом к отдельным вирусам. В клетках GM-3564 произошло повышение чувствительности к полиовирусу 1 типа, и некоторое снижение чувствительности к вирусу Коксаки А7, в то время как чувствительность к Эховирусам 1 и 12 не менялась. В клетках GM-3876 также наблюдалось повышение чувствительности к полиовирусу и снижение чувствительности к вирусу Коксаки А7, и кроме того некоторое повышение чувствительности к Эховирусу 12, при неизменной низкой чувствительности к Эховирусу 1. В клетках GM-3912 наблюдалось лишь некоторое повышение чувствительности к Эховирусу 12 при неизменной чувствительности к остальным трем вирусам.

Различия в чувствительности клеток глиобластом к отдельным вирусам а также наблюдаемые изменения при пассировании могли быть связаны с изменениями репродукции вирусов. Для установления количественных параметров репродукции инфекционных вирусов были определены титры инфекционности в супернатантах культур зараженных предпоследним разведением, вызвавшим цитопатическое действие. Инфекционная доза в предпоследнем разведении составляла около десяти инфекционных единиц на лунку 96-гнездного планшета, что является оптимальной дозой, гарантирующей заражение культуры, и в то же время позволяющей избегать наработку и накопление дефектных интерферирующих частиц. В таблице представлены результаты определения инфекционных титров вирусов в каждой из первичных и пассированных культур клеток глиобластом.

Результаты определения титров частиц подтверждают предположение о том что изменения чувствительности к заражению вирусами в процессе пассирования клеток связаны с более или менее эффективной репликацией того или иного вируса. Так, при пассировании культуры GM3564 репродукция полиовируса возросла более чем в 30 раз, при одновременном трехкратном снижении

продукции вируса Коксаки А7 и практически неизменном уровне репликации Эховирусов 1 и 12. Разнообразные изменения спектров чувствительности отмечались и в двух других культурах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мультиформная глиобластома является крайне агрессивной формой опухолей головного мозга. Геном ее клеток очень нестабилен, в связи с чем популяция клеток опухоли постоянно претерпевает изменения и крайне неоднородна. Если в условиях организма за счет действия ряда факторов наблюдается определенный баланс клеточного состава внутри опухоли, то при переводе в культуру часть клеток может прекратить деления. Это приводит к перерастанию отдельных более приспособленных к культивированию *in vitro* типов опухолевых клеток. В связи с этим можно предположить, что отбор определенных типов клеток в популяции может сопровождаться и изменениями в чувствительности к действию онколитических вирусов.

Полученные в ходе исследования результаты указывают на то что в ходе пассирования первичных опухолей происходят определенные изменения, приводящие к возрастанию или уменьшению чувствительности к отдельным вирусам. Это может быть связано с исходной гетерогенностью популяции опухолевых клеток, которые по ряду причин могут различаться по чувствительности к вирусам. В культуре происходит перерастание определенного клеточного компонента, в результате чего меняется и общий уровень чувствительности к вирусам.

ВЫВОДЫ

Проведенное испытание чувствительности к четырем штаммам онколитических энтеровирусов опухолевых клеток от трех больных глиобластомами дает основание сделать вывод, что опухоли исходно обладают индивидуальными спектрами чувствительности к панели вирусов и что при пассировании происходят качественные изменения чувствительности к отдельным вирусным штаммам. Результаты указывают на необходимость проведения тестирований чувствительности к вирусам на самых ранних стадиях перевода клеток в культуру.

Литература

1. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. N Engl J Med. 2008; 359 (5): 492–507.
2. Mirmanoff RO, Gorla T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann RD, Fisher B, et al. Radiotherapy and temozolomide for newly

- diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol.* 2006; 24 (16): 2563–9. Epub 2006/06/01. DOI: 10.1200/JCO.2005.04.5963. PubMed PMID: 16735709.
3. Сосновцева А. О., Гриненко Н. Ф., Липатова А. В., Чумаков П. М., Чехонин В. П. Онколитические вирусы в терапии злокачественных глиом. *Биомедицинская химия.* 2016 (4): 376–90.
 4. Губанова Н. В., Гайтан А. С., Разумов И. А., Мордвинов В. А., Кривошапкин А. Л., Нетесов С. В., et al. Онколитические вирусы в терапии глиом. *Молекулярная биология.* 2012; 46 (6): 726–38.
 5. Csatory LK, Bakacs T. Use of Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in a patient with high-grade glioblastoma. *JAMA.* 1999; 281 (17): 588–9.
 6. Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther.* 2000; 7 (10): 867–74.
 7. Csatory LK, Gosztonyi G, Szeberenyi J, Fabian Z, Liszka V, Bodey B, et al. MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol.* 2004; 67 (1–2): 83–93.
 8. Iwadata Y, Inoue M, Saegusa T, Tokusumi Y, Kinoh H, Hasegawa M, et al. Recombinant Sendai virus vector induces complete remission of established brain tumors through efficient interleukin-2 gene transfer in vaccinated rats. *Clin Cancer Res.* 2005; 11 (10): 3821–7.
 9. Allen C, Opyrchal M, Aderca I, Schroeder MA, Sarkaria JN, Domingo E, et al. Oncolytic measles virus strains have significant antitumor activity against glioma stem cells. *Gene Ther.* 2012; 23 (10): 62.
 10. Alonso MM, Jiang H, Gomez-Manzano C, Fueyo J. Targeting brain tumor stem cells with oncolytic adenoviruses. *Methods Mol Biol.* 2012; 797: 111–25.
 11. Dey M, Ulasov IV, Lesniak MS. Virotherapy against malignant glioma stem cells. *Cancer Lett.* 2010; 289 (1): 1–10.
 12. Kanai R, Rabkin SD, Yip S, Sgubin D, Zupa CM, Hirose Y, et al. Oncolytic virus-mediated manipulation of DNA damage responses: synergy with chemotherapy in killing glioblastoma stem cells. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104 (1): 42–55.
 13. van den Hengel SK, Balvers RK, Dautzenberg IJ, van den Wollenberg DJ, Kloezeman JJ, Lamfers ML, et al. Heterogeneous reovirus susceptibility in human glioblastoma stem-like cell cultures. *Cancer Gene Ther.* 2013; 20(9): 507–13. Epub 2013/08/03. DOI: 10.1038/cgt.2013.47. PubMed PMID: 23907517.
 14. Zhu Z, Gorman MJ, McKenzie LD, Chai JN, Hubert CG, Prager BC, et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J Exp Med.* 2017; 214 (10): 2843–57. Epub 2017/09/07. doi: 10.1084/jem.20171093. PubMed PMID: 28874392; PubMed Central PMCID: PMC5626408.
 15. Voroshilova MK. Potential use of nonpathogenic enteroviruses for control of human disease. *Prog Med Virol.* 1989; 36: 191–202. Epub 1989/01/01. PubMed PMID: 2555836.

References

1. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008; 359 (5): 492–507.
2. Mirmanoff RO, Gorlia T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann RD, Fisher B, et al. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol.* 2006; 24 (16): 2563–2569. DOI: 10.1200/JCO.2005.04.5963. PubMed PMID: 16735709.
3. Sosnovtceva AO, Grinenko NF, Lipatova AV, Chumakov PM, Chekhonin VP. Onkoliticheskie virusy v terapii zlokachestvennih gliom. *Biomeditsinskaja khimija.* 2016; 62 (4): 376–90. DOI: 10.18097/pbmc20166204376. PubMed PMID: 27562991.
4. Gubanova NV, Gaytan AS, Razumov IA, Mordvinov VA, Krivoschapkin AL, Netesov SV, et al. Onkoliticheskie virusy v terapii gliom. *Molecular Biology.* 2012; 46 (6): 726–38.
5. Csatory LK, Bakacs T. Use of Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in a patient with high-grade glioblastoma. *JAMA.* 1999; 281 (17): 588–589.
6. Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther.* 2000; 7 (10): 867–874.
7. Csatory LK, Gosztonyi G, Szeberenyi J, Fabian Z, Liszka V, Bodey B, et al. MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol.* 2004; 67 (1–2): 83–93.
8. Iwadata Y, Inoue M, Saegusa T, Tokusumi Y, Kinoh H, Hasegawa M, et al. Recombinant Sendai virus vector induces complete remission of established brain tumors through efficient interleukin-2 gene transfer in vaccinated rats. *Clin Cancer Res.* 2005; 11 (10): 3821–27.
9. Allen C, Opyrchal M, Aderca I, Schroeder MA, Sarkaria JN, Domingo E, et al. Oncolytic measles virus strains have significant antitumor activity against glioma stem cells. *Gene Ther.* 2012; 23 (10): 62.
10. Alonso MM, Jiang H, Gomez-Manzano C, Fueyo J. Targeting brain tumor stem cells with oncolytic adenoviruses. *Methods Mol Biol.* 2012; 797: 111–125.
11. Dey M, Ulasov IV, Lesniak MS. Virotherapy against malignant glioma stem cells. *Cancer Lett.* 2010; 289 (1): 1–10.
12. Kanai R, Rabkin SD, Yip S, Sgubin D, Zupa CM, Hirose Y, et al. Oncolytic virus-mediated manipulation of DNA damage responses: synergy with chemotherapy in killing glioblastoma stem cells. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104 (1): 42–55.
13. van den Hengel SK, Balvers RK, Dautzenberg IJ, van den Wollenberg DJ, Kloezeman JJ, Lamfers ML, et al. Heterogeneous reovirus susceptibility in human glioblastoma stem-like cell cultures. *Cancer Gene Ther.* 2013; 20(9): 507–513. DOI: 10.1038/cgt.2013.47. PubMed PMID: 23907517.
14. Zhu Z, Gorman MJ, McKenzie LD, Chai JN, Hubert CG, Prager BC, et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J Exp Med.* 2017; 214 (10): 2843–57. DOI: 10.1084/jem.20171093. PubMed PMID: 28874392; PubMed Central PMCID: PMC5626408.
15. Voroshilova MK. Potential use of nonpathogenic enteroviruses for control of human disease. *Prog Med Virol.* 1989; 36: 191–202. PubMed PMID: 2555836.

ЭНТЕРОВИРУСЫ ЧЕЛОВЕКА ПРОЯВЛЯЮТ ИЗБИРАТЕЛЬНУЮ ОНКОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НА МОДЕЛИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАТОВ МУЛЬТИФОРМНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА В ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШАХ

А. О. Желтухин¹, А. В. Соболева^{1,2}, А. О. Сосновцева^{1,3}, Т. Х. Ле¹, Г. В. Ильинская^{1,4}, Д. В. Кочетков¹, А. В. Липатова¹, П. М. Чумаков^{1,2} ✉

¹ Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта, Москва

² Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова, Москва

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

⁴ Российский онкологический центр имени Н. Н. Блохина, Москва

Основным источником возникновения рецидивов мультиформной глиобластомы после хирургического вмешательства являются стволовые клетки, успевающие проникнуть глубоко в ткани мозга. В настоящее время актуален поиск новых подходов для борьбы с ними, в том числе с помощью онколитических вирусов. Целью работы было определение чувствительности к непатогенным энтеровирусам клеток мультиформной глиобластомы человека, поддерживаемых *in vitro* и в модели мышинных ксенотрансплантатов. Культуры опухолевых клеток глиобластом испытывали на чувствительность к полиовирусу 1 типа (штамм вакцины Сэбина), вирусу Коксаки А7 (штамм ЖЭВ8), Коксаки А9 (штамм ЖЭВ9) и Коксаки В5 (штамм ЖЭВ12). Количественную оценку репродукции вирусов и их цитолитическую активность проводили заражением монослойных культур клеток глиобластомы. Эффективность уничтожения стволовых клеток глиобластомы определяли по способности клеточных культур глиобластом, обогащенных опухолевыми стволовыми клетками, формировать подкожные опухоли у иммунодефицитных мышей после обработки вирусами. По результатам исследования наиболее выраженная онколитическая и репликационная активность выявлена у вируса Коксаки А7 и полиовируса 1 типа при тестировании в модели культур клеток глиобластом, инфицированных вирусами *in vitro*, а также *in vivo*, в модели подкожных опухолевых ксенотрансплантатов на иммунодефицитных мышах. Полиовирус 1 типа и вирус Коксаки А7 предотвращали образование опухолей после того как нейросферные культуры клеток глиобластом преинкубировали с вирусами перед подкожным введением. Вирус Коксаки В5 вызывал лишь частичное сокращение числа опухолей, а Коксаки А9 не влиял на опухолеобразование. Таким образом, ряд штаммов непатогенных энтеровирусов способен уничтожать стволовые клетки глиобластомы и представляется перспективным при разработке терапевтических средств для безрецидивного лечения глиобластом.

Ключевые слова: мультиформная глиобластома, онколитический вирус, непатогенные энтеровирусы, персонализированная медицина, рецидив опухоли, экспериментальная терапия рака

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, уникальный код проекта RFMEFI60714X0014.

✉ **Для корреспонденции:** Петр Михайлович Чумаков
ул. Вавилова, д. 32, г. Москва, 119991; chumakovpm@yahoo.com

Статья получена: 26.06.2018 **Статья принята к печати:** 30.06.18

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.026

HUMAN ENTEROVIRUSES EXHIBIT SELECTIVE ONCOLYTIC ACTIVITY IN THE MODEL OF HUMAN GLIOBLASTOMA MULTIFORME XENOGRAFTS IN IMMUNODEFICIENT MICE

Zhelutukhin AO¹, Soboleva AV^{1,2}, Sosnovtseva AO^{1,3}, Le TH¹, Ilyinskaya GV^{1,4}, Kochetkov DV¹, Lipatova AV¹, Chumakov PM^{1,2} ✉

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

² Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

⁴ Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow

Stem cells that penetrated deeply into the brain tissue are the main reason behind the relapses of glioblastoma multiforme after surgery. Finding new approaches to counter such relapses, including those that make use of oncolytic viruses, is a pressing issue. This study aimed to determine the sensitivity of cells of human glioblastoma multiforme to non-pathogenic enteroviruses, *in vitro* and *in vivo* (mice xenografts model). Glioblastoma tumor cells were exposed to type 1 poliovirus (Sabin vaccine strain), Coxsackie virus A7 (strain LEV8), Coxsackie virus A9 (strain LEV9) and Coxsackie virus B5 (strain LEV14). The virus reproduction intensity and cytolytic activity were assessed through infection of monolayered glioblastoma cell cultures. The ability of glioblastoma cell cultures (enriched with tumor stem cells) to build subcutaneous tumors in immunodeficient mice after those cultures were exposed to viruses signaled the effectiveness of glioblastoma stem cells destruction. The study revealed that Coxsackie virus A7 and type 1 poliovirus possess the most pronounced oncolytic and replicative properties when tested on glioblastoma cells infected with viruses *in vitro* and on subcutaneous tumor xenografts in immunodeficient mice (*in vivo*). Type 1 poliovirus and Coxsackie virus A7 virus prevented development of tumors when glioblastoma neurospheric cell cultures were preincubated with viruses before subcutaneous implantation. Coxsackie virus B5 only managed to reduce the number of tumors developed, and Coxsackie virus A9 did not affect the tumor development at all. Thus, a number of non-pathogenic enteroviruses strains can destroy glioblastoma's stem cells, i.e. they show promise in the context of development of therapeutic agents for relapse-free treatment of glioblastomas.

Keywords: glioblastoma multiforme, oncolytic virus, non-pathogenic enteroviruses, personalized medicine, tumor relapse, experimental cancer therapy

Funding: the study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation; project code RFMEFI60714X0014.

✉ **Correspondence should be addressed:** Peter M Chumakov
Vavilova, 32, Moscow, 119991; chumakovpm@yahoo.com

Received: 26.06.2018 **Accepted:** 30.06.18

DOI: 10.24075/brsmu.2018.026

Терапия опухолей головного мозга по-прежнему остается проблемной, особенно в случае мультиформной глиобластомы, наиболее злокачественной и практически неизлечимой болезни [1]. Инфильтративный рост и расположение в функционально важных областях мозга делают эти опухоли чрезвычайно сложными для хирургического вмешательства. Из-за опасности возникновения неврологических нарушений хирургическое лечение часто ограничивается лишь частичным удалением опухоли. Однако даже в случаях радикального удаления рецидивы заболевания неизбежны, так как иницирующие опухоль стволовые клетки глиобластомы глубоко мигрируют в здоровые области мозга и не могут быть удалены [2–4]. Химио- и радиотерапия также приводят лишь к краткосрочным ремиссиям, после которых неизбежен вторичный рост [4]. Существующие в настоящее время варианты лечения глиобластом почти исчерпаны, что оправдывает поиск новых альтернативных подходов для избирательного и эффективного уничтожения злокачественных клеток. Значительный прогресс в понимании механизмов злокачественного роста и специфических свойств клеток глиобластомы является хорошей основой для разработки инновационных терапевтических подходов. Среди них особенно многообещающим является использование непатогенных онколитических вирусов, которые специфически распознают и уничтожают клетки глиобластомы [5, 6].

Онколитические вирусы для лечения глиом человека разрабатываются на основе вирусов, принадлежащих ко многим семействам, и включают вирусы герпеса, вирус болезни Ньюкасла [7–11], аденовирусы [12–16], парвовирусы [17–19], реовирусы [20–23], энтеровирусы [24–27] и другие [1]. Многочисленные клинические испытания показали отсутствие токсичности препаратов онколитических вирусов [28–31]. Кроме того, в отличие от химио- и таргетной терапии многие онколитические вирусы способны эффективно убивать иницирующие опухоль стволовые клетки [16, 32–37], что безусловно важно для полного излечения пациентов. В настоящее время уже существует широкий арсенал потенциальных вирусных терапевтических штаммов, которые могут быть использованы для дальнейших клинических испытаний. В настоящее время активно изучаются свойства непатогенных штаммов вирусов Коксаки (в частности, А7, А9 и В5), и предварительные данные свидетельствуют о том, что они являются потенциальными терапевтическими агентами [38].

Целью данного исследования было испытание чувствительности опухолевых клеток глиобластомы к онколитическому действию ряда непатогенных онколитических энтеровирусов в моделях *in vitro* и *in vivo* с целью оценки перспектив использования этих вирусов в качестве терапевтических средств для лечения глиобластом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение первичных клеточных культур из опухолей глиобластомы

Фрагменты свежееудаленных у пациентов опухолей хранили не более 12 ч в охлажденной стерильной культуральной среде. Кусочки опухоли механически отделяли от участков некроза, элементов стромы, кровеносных сосудов, и измельчали путем аккуратного продавливания через нейлоновую сетку с размером пор 50 мкм. Суспензию агрегатов опухолевых клеток промывали изотоническим

фосфатным буферным раствором (PBS) и инкубировали в 25 объемах раствора коллагеназы 4 (ПанЭко, Москва) в течение 25 мин при 30 °С. Для получения монослойной культуры клеток глиобластомы обработанную коллагеназой суспензию дважды промывали средой DMEM (ПанЭко, Москва) и помещали в среду DMEM-F12, добавив 10% эмбриональной сыворотки теленка и по 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина при плотности 10^5 кл./мл. Планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С с заменой среды через каждые 4 дня, до образования монослоев. Монослойные культуры устанавливали примерно через 18–25 дней инкубации на 10-сантиметровых культуральных чашках.

Рост опухолевых ксенотрансплантатов на иммунодефицитных мышах

Ксенотрансплантаты подкожных опухолей получали в результате инъекции нейросфер, образованных из глиобластом путем альтернативного способа высевания клеток после обработки фрагментов опухоли коллагеназой 4 (ПанЭко, Москва). Клетки высевали в плотности 10^4 кл./мл в среду DMEM-F12 с добавлением по 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина, 20 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF) и 10 нг/мл фактора роста фибробластов (bFGF). Культуры выдерживали в CO₂-инкубаторе при 37 °С в течение 2 недель с заменой среды каждые 4 дня до появления видимых нейросфер. Нейросферы обогащены стволовыми клетками глиобластомы и обладают повышенной опухолеговой активностью при инъекции иммунодефицитным мышам. Для имплантации нейросферы дважды промывали PBS, подсчитывали с помощью гемоцитометра и по 200 нейросфер вводили подкожно в плечевую область 3–5-недельных бестимусных мышей линии Balb/c. Рост опухоли контролировали каждые 3 дня, а общее количество опухолей оценивали на 21-й день.

Штаммы онколитических вирусов

В работе использовали непатогенные штаммы энтеровирусов человека из коллекции лаборатории: полиовирус 1 типа (вакцинный штамм Сэбина), вирусы Коксаки А7 (штамм ЖЭВ8), Коксаки А9 (штамм ЖЭВ9) и Коксаки В5 (штамм ЖЭВ14) [38, 39]. Энтеровирусы выращивали в клетках Vero. Вирусные титры, выраженные как TCID₅₀/мл, определяли путем инфицирования клеток Vero серийными разведениями вирусосодержащей жидкости.

Испытание чувствительности клеток глиобластом к вирусам

Для определения дифференциальной чувствительности к панели онколитических энтеровирусов опухолевых клеток, прошедших после эксплантации минимальное число пассирований в культуре, был использован опухолевый материал от двух пациентов с глиобластомами. Полученные от этих пациентов культуры обозначались как GM-3564 и GM-3876. Заражение культур проводили в 96-луночных планшетах для культивирования клеток (SPL Lifesciences, Республика Корея). Субконфлюэнтные однодневные монослои культур клеток GM-3564 и GM-3876, а также контрольных культур Vero инкубировали с 0,1 мл серийных разведений вирусов. Спустя 7 ч после заражения культур серийными десятикратными разведениями вирусных препаратов, представляющих четыре непатогенных энтеровируса,

определяли жизнеспособность клеток Цитопатическую активность оценивали через 72 ч с помощью набора реагентов для оценки жизнеспособности клеток (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega, США), согласно рекомендациям производителя.

Введение вируса *in vivo*

Для измерения способности вирусов предотвращать образование опухолей при введении нейросфер, перед подкожным введением нейросферы инкубировали с вирусами (2×10^6 инфекционных единиц (и.е.) вирусов в объеме 0,1 мл в течение 30 мин при 37 °С).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные из опухолевого материала двух пациентов монослойные культуры глиобластом были испытывали на чувствительность к четырем штаммам энтеровирусов. Для клеток GM-3564 наиболее сильную литическую активность оказывал вирус Коксаки А7, несколько более слабую проявлял полиовирус 1 типа (рис. 1) В культуре GM-3876 наблюдали противоположную картину: в этих

клетках наиболее сильной инфицирующей и литической активностью обладал полиовирус 1 типа, тогда как вирус Коксаки А7 демонстрировал аналогичное действие только при дозах вируса, приблизительно в десять раз больших. Обе культуры были относительно устойчивы к действию вируса Коксаки В5 и почти полностью устойчивы к вирусу Коксаки А9. Этот последний штамм вируса оказывал небольшое токсическое действие только при максимальных дозах. Между тем, при инфицировании теми же дозами вирусов контрольной культуры клеток Vero все четыре вируса начинали оказывать цитотоксическое действие при примерно одинаковых дозах. Таким образом, две культуры глиобластом обладают явной селективностью в отношении их способности инфицироваться и лизироваться различными вирусными штаммами, что, по-видимому, обусловлено различием в их способности поддерживать репликацию этих вирусов.

Чтобы установить способность вирусных штаммов предотвращать образование подкожных опухолей при инъекции ксенотрансплантатов иммунодефицитным мышам, из опухолевого материала пациентов с глиобластомой получили культуры нейросфер. Нейросферы обогащены опухолеобразующими стволовыми клетками, и поэтому

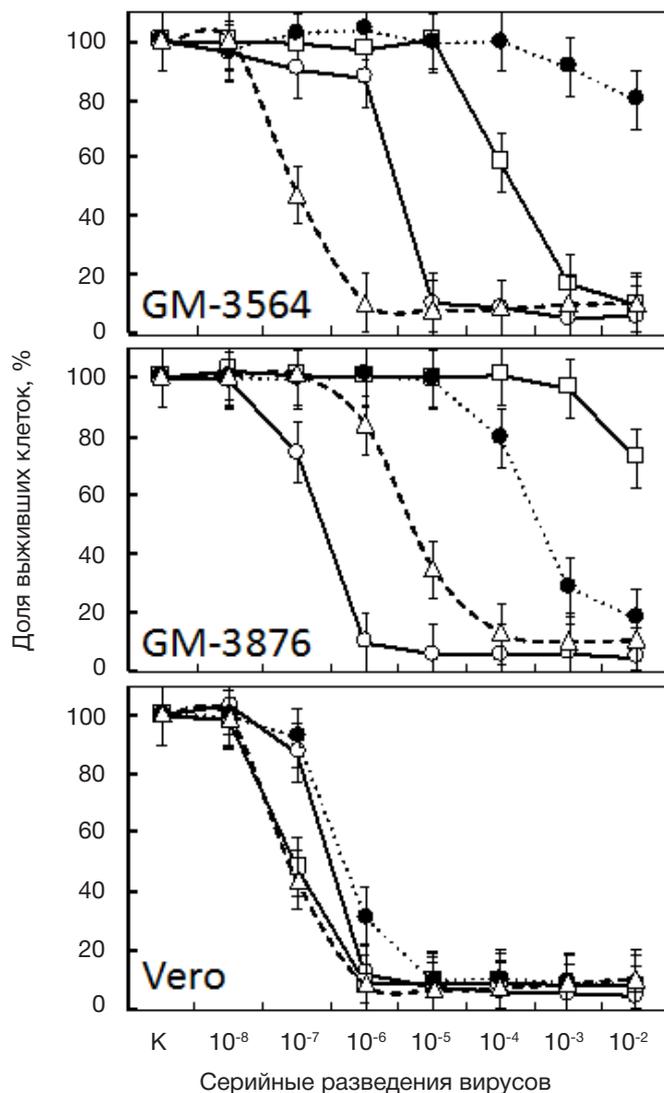


Рис. 1. Чувствительность монослойных культур ранних пассажей, полученных от двух пациентов с глиобластомами, к четырем штаммам онколитических энтеровирусов: —○— полиовирус 1 типа; - -△- - вирус Коксаки А7; —□— вирус Коксаки А9; ...●... Вирус Коксаки В5. Горизонтальная ось: 10^{-8} – 10^{-2} — десятикратные серийные разведения вирусных препаратов, использованные для заражения. Vero — контрольная культура клеток чувствительная ко всем четырем типам вирусов

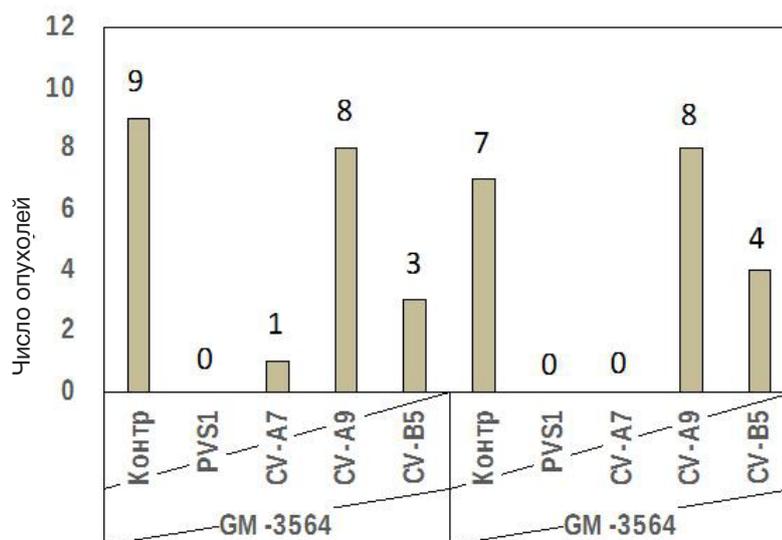


Рис. 2. Тест на подавление опухолеобразования нейросфер глиобластом после их предобработки каждым из четырех вирусов перед подкожной инъекцией иммунодефицитным мышам. Столбики отражают число опухолей, образовавшихся в каждой группе мышей, контрольных (Контр) и после обработки вирусами. PVS1 — полиовирус 1 типа; CV-A7 — вирус Коксаки А7; CV-A9 — вирус Коксаки А9; CV-B5 — вирус Коксаки В5

их опухолеогенность значительно выше по сравнению с монослойными культурами клеток глиобластом. Чтобы получить культуры нейросфер, среда должна содержать специфические ростовые факторы EGF и bFGF. Кроме того, при получении нейросфер из фрагментов опухоли больного требуется произвести расщепление в пластиковую посуду, не поддерживающую прикрепление клеток. В таких условиях клетки глиобластом образуют сфероидные агрегаты, или нейросферы, состоящие из многих клеток, причем нейросферы обогащены опухолеобразующими стволовыми клетками. Поскольку подсчет числа отдельных клеток в сфероидах затруднен, для стандартизации процедуры подкожного введения с целью получения опухолей мы проводили подсчет самих нейросфер. В нашем предварительном исследовании было установлено, что введение 200 нейросфер воспроизводимо приводит к образованию опухолей в течение 1–2,5 недель. Контрольной группе из пяти мышей вводили подкожно в область плеча с обеих сторон по 200 нейросфер в объеме 0,5 мл. Такое же число мышей использовали при испытании влияния вирусов на опухолеобразование. Таким образом, в каждой группе мышей могло образовываться до 10 опухолей. Чтобы проверить способность вирусов предотвращать образование опухолей из инъецированных нейросфер, последние инкубировали с вирусами (см. «Материалы и методы»). Для каждого типа вирусов использовали пять мышей, которых инъецировали в две точки суспензией, содержащей обработанные вирусами нейросферы, и подсчет образовавшихся опухолей проводили через 21 день после инъекций. Оценка опухолей не включала измерение их размеров (рис. 2). В контрольной группе мышей, инъецированных нейросферами клеток GM-5564, образовалось 9 опухолей (из 10 возможных). Обработка полиовирусом 1 типа полностью подавляла образование опухолей, а после обработки вирусом Коксаки А7 появилась только одна опухоль, причем на более позднем сроке. После обработки вирусом Коксаки В5 образовалось три опухоли, а вирус Коксаки А9 практически не препятствовал формированию опухолей (8 опухолей). Принципиально похожие результаты мы наблюдали в группах мышей, которым вводили нейросферы клеток GM-3876: в контрольной группе образовалось 8 опухолей (из 10 возможных); после обработки полиовирусом и

вирусом Коксаки А7 опухоли отсутствовали; в группе, обработанной вирусом Коксаки В5, появилось 4 опухоли, а вирусом Коксаки А9 — 8 опухолей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Культуры нейросфер являются наиболее адекватной моделью для анализа терапевтического потенциала средств борьбы с глиобластомами [40]. Это объясняется тем, что нейросферы обогащены опухолевыми стволовыми клетками, которые служат основным источником рецидива заболевания вследствие их особой устойчивости к большинству терапевтических воздействий [41]. В данном исследовании мы провели анализ способности четырех непатогенных онколитических энтеровирусов предотвращать образование экспериментальных подкожных опухолевых ксенотрансплантатов, полученных при введении нейросфер, образовавшихся из опухолевого материала двух больных глиобластомой. Полученные данные указывают на высокий потенциал двух вирусных штаммов — полиовируса 1 типа и вируса Коксаки А7. Однако нейросферы от двух разных больных демонстрировали различную степень чувствительности к этим вирусам, что указывает на необходимость персонализированного подбора наиболее эффективных терапевтических штаммов после предварительного анализа биопсийного или операционного материала, полученного из опухолей пациентов. Недавно опубликованные результаты клинических испытаний рекомбинантного полиовируса PVSRIP0 указывают на возможность длительных ремиссий у 21% больных глиобластомами, в то время как у остальных пациентов полиовирус не оказывал терапевтического действия [42]. Дополнение арсенала терапевтических штаммов вирусами, обладающими иными спектрами воздействия на опухоли, сможет существенно повысить процент случаев, поддающихся успешному лечению этого заболевания.

Выводы

По результатам проведенного исследования можно сделать вывод о том, что способность каждого из четырех штаммов непатогенных онколитических энтеровирусов оказывать цитолитическое действие в монослойных культурах

клеток глиобластом человека хорошо коррелирует со способностью тех же штаммов предотвращать образование опухоли в результате ксенотрансплантации иммунодефицитным мышам. Таким образом, существует явная взаимосвязь между эффектами вирусов *in vitro* и их онколитической активностью *in vivo*. Кроме того, обнаружено, что вирусы, которые могут эффективно реплицироваться в монослойных

культурах клеток глиобластом, способны эффективно убивать опухолеобразующие стволовые клетки глиобластом, что указывает на высокий потенциал онколитических вирусов в предотвращении рецидивов опухоли. Различия в чувствительности к вирусам опухолевых клеток, полученных от двух пациентов, указывают на необходимость персонализированного подбора терапевтических штаммов.

Литература

1. Губанова Н. В., Гайтан А. С., Разумов И. А., Мордвинов В. А., Кривошапкин А. Л., Нетесов С. В., и др. Онколитические вирусы в терапии глиом. Молекулярная биология. 2012; 46 (6): 726–38.
2. Greenberg MS. Handbook of Neurosurgery. 7th ed. New York: Thieme Publishers; 2010.
3. Park DM, Rich JN. Biology of glioma cancer stem cells. *Molecules and cells*. 2009; 28 (1): 7–12. DOI: 10.1007/s10059-009-0111-2. PubMed PMID: 19655094.
4. Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol*. 2007; 114 (5): 443–58. DOI: 10.1007/s00401-007-0293-7. PubMed PMID: 17805551; PubMed Central PMCID: PMCPMC2039798.
5. Buonaguro FM, Tornesello ML, Izzo F, Buonaguro L. Oncolytic virus therapies. *Pharmaceutical patent analyst*. 2012; 1 (5): 621–27. DOI: 10.4155/ppa.12.65. PubMed PMID: 24236929.
6. Parker JN, Bauer DF, Cody JJ, Markert JM. Oncolytic viral therapy of malignant glioma. *Neurotherapeutics*. 2009; 6 (3): 558–69.
7. Zukifli MM, Ibrahim R, Ali AM, Aini I, Jaafar H, Hilda SS, et al. Newcastle disease virus strain V4UPM displayed oncolytic ability against experimental human malignant glioma. *Neurological research*. 2009; 31 (1): 3–10. DOI: 10.1179/174313208x325218. PubMed PMID: 18937888.
8. Wagner S, Csatory CM, Gosztanyi G, Koch HC, Hartmann C, Peters O, et al. Combined treatment of pediatric high-grade glioma with the oncolytic viral strain MTH-68/H and oral valproic acid. *Apmis*. 2006; 114 (10): 731–43.
9. Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, Linetsky E, Rasooly L, Greenbaum E, et al. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol Ther*. 2006; 13 (1): 221–28.
10. Csatory LK, Gosztanyi G, Szeberenyi J, Fabian Z, Liszka V, Bodey B, et al. MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol*. 2004; 67 (1–2): 83–93.
11. Csatory LK, Bakacs T. Use of Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in a patient with high-grade glioblastoma. *JAMA*. 1999; 281 (17): 588–89.
12. Tsamis KI, Alexiou GA, Vartholomatos E, Kyritsis AP. Combination treatment for glioblastoma cells with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and oncolytic adenovirus delta-24. *Cancer Invest*. 2013; 31 (9): 630–38. DOI: 10.3109/07357907.2013.849724. PubMed PMID: 24164301.
13. Li X, Mao Q, Wang D, Xia H. A novel Ad5/11 chimeric oncolytic adenovirus for improved glioma therapy. *Int J Oncol*. 2012; 41 (6): 2159–65. DOI: 10.3892/ijo.2012.1674. PubMed PMID: 23117867.
14. Alonso MM, Jiang H, Gomez-Manzano C, Fueyo J. Targeting brain tumor stem cells with oncolytic adenoviruses. *Methods Mol Biol*. 2012; 797: 111–25.
15. Ahmed AU, Ulasov IV, Mercer RW, Lesniak MS. Maintaining and loading neural stem cells for delivery of oncolytic adenovirus to brain tumors. *Methods Mol Biol*. 2012; 797: 97–109.
16. Gomez-Manzano C, Fueyo J. Oncolytic adenoviruses for the treatment of brain tumors. *Curr Opin Mol Ther*. 2010; 12 (5): 530–37.
17. Lacroix J, Schlund F, Leuchs B, Adolph K, Sturm D, Bender S, et al. Oncolytic effects of parvovirus H-1 in medulloblastoma are associated with repression of master regulators of early neurogenesis. *Int J Cancer*. 2014; 134 (3): 703–16. DOI: 10.1002/ijc.28386. PubMed PMID: 23852775.
18. Paglino JC, Ozduman K, van den Pol AN. Lull1 parvovirus selectively and efficiently targets, replicates in, and kills human glioma cells. *J Virol*. 2012; 86 (13): 7280–91.
19. Geletneky K, Huesing J, Rommelaere J, Schlehofer JR, Leuchs B, Dahm M, et al. Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol. *BMC cancer*. 2012; 12: 99.
20. Kicielski KP, Chiocca EA, Yu JS, Gill GM, Coffey M, Markert JM. Phase 1 clinical trial of intratumoral reovirus infusion for the treatment of recurrent malignant gliomas in adults. *Mol Ther*. 2014; 22 (5): 1056–62. DOI: 10.1038/mt.2014.21. PubMed PMID: 24553100; PubMed Central PMCID: PMCPMC4015229.
21. van den Wollenberg DJ, Dautzenberg IJ, van den Hengel SK, Cramer SJ, de Groot RJ, Hoeben RC. Isolation of reovirus T3D mutants capable of infecting human tumor cells independent of junction adhesion molecule-A. *PLoS One*. 2012; 7 (10): e48064. DOI: 10.1371/journal.pone.0048064. PubMed PMID: 23110175; PubMed Central PMCID: PMCPMC3480499.
22. Forsyth P, Roldan G, George D, Wallace C, Palmer CA, Morris D, et al. A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas. *Mol Ther*. 2008; 16 (3): 627–32.
23. Wilcox ME, Yang W, Senger D, Rewcastle NB, Morris DG, Brasher PM, et al. Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93 (12): 903–12. PubMed PMID: 11416111.
24. Goetz C, Dobrikova E, Shveygert M, Dobrikov M, Gromeier M. Oncolytic poliovirus against malignant glioma. *Future Virol*. 2011; 6 (9): 1045–58.
25. Goetz C, Gromeier M. Preparing an oncolytic poliovirus recombinant for clinical application against glioblastoma multiforme. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010; 21 (2–3): 197–203. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2010.02.005. PubMed PMID: 20299272; PubMed Central PMCID: PMCPMC2881183.
26. Dobrikova EY, Broadt T, Poiley-Nelson J, Yang X, Soman G, Giardina S, et al. Recombinant oncolytic poliovirus eliminates glioma *in vivo* without genetic adaptation to a pathogenic phenotype. *Mol Ther*. 2008; 16 (11): 1865–72.
27. Gromeier M, Lachmann S, Rosenfeld MR, Gutin PH, Wimmer E. Intergenic poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97 (12): 6803–08.
28. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, Chiocca EA. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. *JAMA oncology*. 2017; 3 (6): 841–49. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.2064. PubMed PMID: 27441411.
29. Pol J, Buque A, Aranda F, Bloy N, Cremer I, Eggemont A, et al. Trial Watch-Oncolytic viruses and cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2016; 5 (2): e1117740. DOI: 10.1080/2162402x.2015.1117740. PubMed PMID: 27057469; PubMed Central PMCID: PMCPMC4801444.
30. Taguchi S, Fukuhara H, Homma Y, Todo T. Current status of clinical trials assessing oncolytic virus therapy for urological cancers. *Int J Urol*. 2017; 24 (5): 342–51. DOI: 10.1111/iju.13325. PubMed PMID: 28326624.
31. Warner SG, O'Leary MP, Fong Y. Therapeutic oncolytic viruses: clinical advances and future directions. *Curr Opin Oncol*. 2017;

- 29 (5): 359–65. DOI: 10.1097/cco.0000000000000388. PubMed PMID: 28678032.
32. Bach P, Abel T, Hoffmann C, Gal Z, Braun G, Voelker I, et al. Specific elimination of CD133+ tumor cells with targeted oncolytic measles virus. *Cancer Res.* 2013; 73 (2): 865–74. DOI: 10.1158/0008-5472.can-12-2221. PubMed PMID: 23293278.
33. Berghauer Pont LM, Balvers RK, Kloezeman JJ, Nowicki MO, van den Bossche W, Kremer A, et al. In vitro screening of clinical drugs identifies sensitizers of oncolytic viral therapy in glioblastoma stem-like cells. *Gene Ther.* 2015. DOI: 10.1038/gt.2015.72. PubMed PMID: 26196249.
34. Dey M, Ulasov IV, Lesniak MS. Virotherapy against malignant glioma stem cells. *Cancer Lett.* 2010; 289 (1): 1–10.
35. Liu J, Ma L, Xu J, Liu C, Zhang J, Liu J, et al. Spheroid body-forming cells in the human gastric cancer cell line MKN-45 possess cancer stem cell properties. *Int J Oncol.* 2013; 42 (2): 453–59. DOI: 10.3892/ijo.2012.1720. PubMed PMID: 23229446; PubMed Central PMCID: PMC3583623.
36. Sgubin D, Wakimoto H, Kanai R, Rabkin SD, Martuza RL. Oncolytic herpes simplex virus counteracts the hypoxia-induced modulation of glioblastoma stem-like cells. *Stem cells translational medicine.* 2012; 1 (4): 322–32. DOI: 10.5966/sctm.2011-0035. PubMed PMID: 23197811; PubMed Central PMCID: PMC3659700.
37. van den Hengel SK, Balvers RK, Dautzenberg IJ, van den Wollenberg DJ, Kloezeman JJ, Lamfers ML, et al. Heterogeneous reovirus susceptibility in human glioblastoma stem-like cell cultures. *Cancer Gene Ther.* 2013; 20 (9): 507–13. DOI: 10.1038/cgt.2013.47. PubMed PMID: 23907517.
38. Чумаков П. М., Морозова В. В., Бабкин И. В., Байков И. К., Нетесов С. В., Тикунова Н. В. Онколитические энтеровирусы. Молекулярная биология. 2012; 46 (6): 712–25.
39. Ворошилова М. К., Магазаник С. С., Чумаков П. М. Полезные вирусы человека. Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний. Ташкент: Медицина; 1980. p. 227–29.
40. Wang X, Yang K, Xie Q, Wu Q, Mack SC, Shi Y, et al. Purine synthesis promotes maintenance of brain tumor initiating cells in glioma. *Nature neuroscience.* 2017; 20 (5): 661–73. DOI: 10.1038/nn.4537. PubMed PMID: 28346452; PubMed Central PMCID: PMC6015494.
41. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* 2015; 29 (12): 1203–17. DOI: 10.1101/gad.261982.115. PubMed PMID: 26109046; PubMed Central PMCID: PMC34495393.
42. Desjardins A, Gromeier M, Herndon JE, 2nd, Beaubier N, Bolognesi DP, Friedman AH, et al. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N Engl J Med.* 2018; DOI: 10.1056/NEJMoa1716435. PubMed PMID: 29943666.

References

1. Gubanov NV, Gaytan AS, Razumov IA, Mordvinov VA, Krivoschapkin AL, Netesov SV, i dr. *Onkolyticheskie virusy v terapii gliom. Molekuljarnaja biologija.* 2012; 46 (6): 726–38.
2. Greenberg MS. *Handbook of Neurosurgery.* 7th ed. New York: Thieme Publishers; 2010.
3. Park DM, Rich JN. Biology of glioma cancer stem cells. *Molecules and cells.* 2009; 28 (1): 7–12. DOI: 10.1007/s10059-009-0111-2. PubMed PMID: 19655094.
4. Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol.* 2007; 114 (5): 443–58. DOI: 10.1007/s00401-007-0293-7. PubMed PMID: 17805551; PubMed Central PMCID: PMC2039798.
5. Buonaguro FM, Tornesello ML, Izzo F, Buonaguro L. Oncolytic virus therapies. *Pharmaceutical patent analyst.* 2012; 1 (5): 621–27. DOI: 10.4155/ppa.12.65. PubMed PMID: 24236929.
6. Parker JN, Bauer DF, Cody JJ, Markert JM. Oncolytic viral therapy of malignant glioma. *Neurotherapeutics.* 2009; 6 (3): 558–69.
7. Zulkifli MM, Ibrahim R, Ali AM, Aini I, Jaafar H, Hilda SS, et al. Newcastle diseases virus strain V4UPM displayed oncolytic ability against experimental human malignant glioma. *Neurological research.* 2009; 31 (1): 3–10. DOI: 10.1179/174313208x325218. PubMed PMID: 18937888.
8. Wagner S, Csatory CM, Gosztonyi G, Koch HC, Hartmann C, Peters O, et al. Combined treatment of pediatric high-grade glioma with the oncolytic viral strain MTH-68/H and oral valproic acid. *Apmis.* 2006; 114 (10): 731–43.
9. Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, Linetsky E, Rasooly L, Greenbaum E, et al. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol Ther.* 2006; 13 (1): 221–28.
10. Csatory LK, Gosztonyi G, Szeberenyi J, Fabian Z, Liszka V, Bodey B, et al. MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol.* 2004; 67 (1–2): 83–93.
11. Csatory LK, Bakacs T. Use of Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in a patient with high-grade glioblastoma. *JAMA.* 1999; 281 (17): 588–89.
12. Tsamis KI, Alexiou GA, Vartholomatos E, Kyritsis AP. Combination treatment for glioblastoma cells with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and oncolytic adenovirus delta-24. *Cancer Invest.* 2013; 31 (9): 630–38. DOI: 10.3109/07357907.2013.849724. PubMed PMID: 24164301.
13. Li X, Mao Q, Wang D, Xia H. A novel Ad5/11 chimeric oncolytic adenovirus for improved glioma therapy. *Int J Oncol.* 2012; 41 (6): 2159–65. DOI: 10.3892/ijo.2012.1674. PubMed PMID: 23117867.
14. Alonso MM, Jiang H, Gomez-Manzano C, Fueyo J. Targeting brain tumor stem cells with oncolytic adenoviruses. *Methods Mol Biol.* 2012; 797: 111–25.
15. Ahmed AU, Ulasov IV, Mercer RW, Lesniak MS. Maintaining and loading neural stem cells for delivery of oncolytic adenovirus to brain tumors. *Methods Mol Biol.* 2012; 797: 97–109.
16. Gomez-Manzano C, Fueyo J. Oncolytic adenoviruses for the treatment of brain tumors. *Curr Opin Mol Ther.* 2010; 12 (5): 530–37.
17. Lacroix J, Schlund F, Leuchs B, Adolph K, Sturm D, Bender S, et al. Oncolytic effects of parvovirus H-1 in medulloblastoma are associated with repression of master regulators of early neurogenesis. *Int J Cancer.* 2014; 134 (3): 703–16. DOI: 10.1002/ijc.28386. PubMed PMID: 23852775.
18. Paglino JC, Ozduman K, van den Pol AN. Lull1 parvovirus selectively and efficiently targets, replicates in, and kills human glioma cells. *J Virol.* 2012; 86 (13): 7280–91.
19. Geletneky K, Huesing J, Rommelaere J, Schlehofer JR, Leuchs B, Dahm M, et al. Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol. *BMC cancer.* 2012; 12: 99.
20. Kicielinski KP, Chiocca EA, Yu JS, Gill GM, Coffey M, Markert JM. Phase 1 clinical trial of intratumoral reovirus infusion for the treatment of recurrent malignant gliomas in adults. *Mol Ther.* 2014; 22 (5): 1056–62. DOI: 10.1038/mt.2014.21. PubMed PMID: 24553100; PubMed Central PMCID: PMC34015229.
21. van den Wollenberg DJ, Dautzenberg IJ, van den Hengel SK, Cramer SJ, de Groot RJ, Hoebein RC. Isolation of reovirus T3D mutants capable of infecting human tumor cells independent of junction adhesion molecule-A. *PLoS One.* 2012; 7 (10): e48064. DOI: 10.1371/journal.pone.0048064. PubMed PMID: 23110175; PubMed Central PMCID: PMC3480499.
22. Forsyth P, Roldan G, George D, Wallace C, Palmer CA, Morris D, et al. A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas. *Mol Ther.* 2008; 16 (3): 627–32.
23. Wilcox ME, Yang W, Senger D, Rewcastle NB, Morris DG, Brasher PM, et al. Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas. *J Natl Cancer Inst.* 2001;

- 93 (12): 903–12. PubMed PMID: 11416111.
24. Goetz C, Dobrikova E, Shveygert M, Dobrikov M, Gromeier M. Oncolytic poliovirus against malignant glioma. *Future Virol.* 2011; 6 (9): 1045–58.
 25. Goetz C, Gromeier M. Preparing an oncolytic poliovirus recombinant for clinical application against glioblastoma multiforme. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21 (2–3): 197–203. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2010.02.005. PubMed PMID: 20299272; PubMed Central PMCID: PMCPMC2881183.
 26. Dobrikova EY, Broadt T, Poiley-Nelson J, Yang X, Soman G, Giardina S, et al. Recombinant oncolytic poliovirus eliminates glioma in vivo without genetic adaptation to a pathogenic phenotype. *Mol Ther.* 2008; 16 (11): 1865–72.
 27. Gromeier M, Lachmann S, Rosenfeld MR, Gutin PH, Wimmer E. Intergenic poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97 (12): 6803–08.
 28. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, Chiocci EA. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. *JAMA oncology.* 2017; 3 (6): 841–49. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.2064. PubMed PMID: 27441411.
 29. Pol J, Buque A, Aranda F, Bloy N, Cremer I, Eggermont A, et al. Trial Watch-Oncolytic viruses and cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2016; 5 (2): e1117740. DOI: 10.1080/2162402x.2015.1117740. PubMed PMID: 27057469; PubMed Central PMCID: PMCPMC4801444.
 30. Taguchi S, Fukuhara H, Homma Y, Todo T. Current status of clinical trials assessing oncolytic virus therapy for urological cancers. *Int J Urol.* 2017; 24 (5): 342–51. DOI: 10.1111/iju.13325. PubMed PMID: 28326624.
 31. Warner SG, O'Leary MP, Fong Y. Therapeutic oncolytic viruses: clinical advances and future directions. *Curr Opin Oncol.* 2017; 29 (5): 359–65. DOI: 10.1097/cco.0000000000000388. PubMed PMID: 28678032.
 32. Bach P, Abel T, Hoffmann C, Gal Z, Braun G, Voelker I, et al. Specific elimination of CD133+ tumor cells with targeted oncolytic measles virus. *Cancer Res.* 2013; 73 (2): 865–74. DOI: 10.1158/0008-5472.can-12-2221. PubMed PMID: 23293278.
 33. Berghauer Pont LM, Balvers RK, Kloezeman JJ, Nowicki MO, van den Bossche W, Kremer A, et al. In vitro screening of clinical drugs identifies sensitizers of oncolytic viral therapy in glioblastoma stem-like cells. *Gene Ther.* 2015. DOI: 10.1038/gt.2015.72. PubMed PMID: 26196249.
 34. Dey M, Ulasov IV, Lesniak MS. Virotherapy against malignant glioma stem cells. *Cancer Lett.* 2010; 289 (1): 1–10.
 35. Liu J, Ma L, Xu J, Liu C, Zhang J, Liu J, et al. Spheroid body-forming cells in the human gastric cancer cell line MKN-45 possess cancer stem cell properties. *Int J Oncol.* 2013; 42 (2): 453–59. DOI: 10.3892/ijo.2012.1720. PubMed PMID: 23229446; PubMed Central PMCID: PMCPMC3583623.
 36. Sgubin D, Wakimoto H, Kanai R, Rabkin SD, Martuza RL. Oncolytic herpes simplex virus counteracts the hypoxia-induced modulation of glioblastoma stem-like cells. *Stem cells translational medicine.* 2012; 1 (4): 322–32. DOI: 10.5966/sctm.2011-0035. PubMed PMID: 23197811; PubMed Central PMCID: PMCPMC3659700.
 37. van den Hengel SK, Balvers RK, Dautzenberg IJ, van den Wollenberg DJ, Kloezeman JJ, Lamfers ML, et al. Heterogeneous reovirus susceptibility in human glioblastoma stem-like cell cultures. *Cancer Gene Ther.* 2013; 20 (9): 507–13. DOI: 10.1038/cgt.2013.47. PubMed PMID: 23907517.
 38. Chumakov PM, Morozova VV, Babkin IV, Baykov IK, Netesov SV, Tikunova NV. Onkoliticheskie enterovirusy. *Molekuljarnaja biologija.* 2012; 46 (6): 712–25.
 39. Voroshilova MK, Magazanik SS, Chumakov PM. Poleznye virusy cheloveka. Aktual'nye voprosy epidemiologii, mikrobiologii i infekcionnyh zabolevaniy. Tashkent: Medicina; 1980. p. 227–29.
 40. Wang X, Yang K, Xie Q, Wu Q, Mack SC, Shi Y, et al. Purine synthesis promotes maintenance of brain tumor initiating cells in glioma. *Nature neuroscience.* 2017; 20 (5): 661–73. DOI: 10.1038/nn.4537. PubMed PMID: 28346452; PubMed Central PMCID: PMCPMC6015494.
 41. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* 2015; 29 (12): 1203–17. DOI: 10.1101/gad.261982.115. PubMed PMID: 26109046; PubMed Central PMCID: PMCPMC4495393.
 42. Desjardins A, Gromeier M, Herndon JE, 2nd, Beaubier N, Bolognesi DP, Friedman AH, et al. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N Engl J Med.* 2018; DOI: 10.1056/NEJMoa1716435. PubMed PMID: 29943666.

ГЕМОДИНАМИКА МАТКИ И СОСТОЯНИЕ ОВАРИАЛЬНОГО РЕЗЕРВА В ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

А. К. Рабаданова, ✉ Р. И. Шалина, Н. А. Гугушвили

Кафедра акушерства и гинекологии, педиатрический факультет,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова

Эффективность программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) зависит от ряда факторов, среди которых большое значение имеют эмбриональный и эндометриальный. Каждый из этих факторов напрямую зависит от овариального резерва, определяющего качество ооцитов и изменение доплерометрических показателей в матке, которые отражают снижение внутриматочной перфузии. Целью исследования было прогнозирование эффективности циклов ЭКО и переноса эмбрионов (ПЭ) у пациенток с различным овариальным резервом на основании определения объема кровотока в матке в день переноса эмбриона с помощью 3D-УЗИ с функцией энергетической доплерографии. У 56 пациенток с различным овариальным резервом произведено измерение параметров кровотока с помощью 3D-УЗИ и прикладной программы VOCAL (Virtual Organ Computer-aided AnaLysis) в матке, субэндометриальной зоне и в эндометрии в день переноса эмбриона с последующей оценкой эффективности циклов ЭКО. В ходе работы установлена зависимость между параметрами 3D-кровотока в матке и субэндометриальной зоне и эффективностью циклов ЭКО и ПЭ. При исследовании кровотока в эндометрии такая зависимость не выявлена. Таким образом, использование 3D-УЗИ с функцией энергетической доплерографии в день переноса эмбриона позволяет судить о степени выраженности рецептивности эндометрия и может быть использовано в качестве прогностического критерия для определения вероятности наступления беременности в цикле ЭКО.

Ключевые слова: экстракорпоральное оплодотворение, сниженный овариальный резерв, маточный кровоток, 3D-УЗИ с функцией энергетической доплерографии

✉ **Для корреспонденции:** Асият Рабаданова
ул. Мневники, д. 23, к. 254, г. Москва, 123423; asyakubataeva@gmail.com

Статья получена: 15.03.2018 **Статья принята к печати:** 20.03.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.015

UTERINE HEMODYNAMICS AND OVARIAN RESERVE QUALITY IN THE PREDICTION OF IN VITRO FERTILIZATION OUTCOMES

Rabadanova AK, ✉ Shalina RI, Gugushvili NA

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Pediatrics,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

There are a few major factors determining the success of in vitro fertilization (IVF), including the potential of embryos to implant and the receptivity of the endometrium, which, in turn, are directly dependent on the ovarian reserve, i.e. the quality and quantity of oocytes. Diminished ovarian reserve can be inferred from reduced blood flow to the uterus on Doppler sonography. Based on the results of 3D power Doppler imaging of uterine blood flow on the day of ET and Virtual Organ Computer-aided AnaLysis (VOCAL), we attempted to predict the outcomes of IVF and embryo transfer (ET) in 56 female patients with different ovarian reserves. Blood flow was measured in the uterus, subendometrial region and endometrium, and IVF cycle outcomes were subsequently assessed. We have established an association between the characteristics of uterine and subendometrial blood flow and the outcomes of IVF cycles and ET. No such association has been established for the endometrium, though. Therefore, a 3D power Doppler examination on the day of embryo transfer provides valuable information on the endometrium receptivity and can be used as a prognostic marker of IVF success.

Keywords: IVF, 3D power Doppler, diminished ovarian reserve, poor ovarian response, uterine blood flow

✉ **Correspondence should be addressed:** Asiyat Rabadanova
Mnevniky 23, k. 254, Moscow, 123423; asyakubataeva@gmail.com

Received: 15.03.2018 **Accepted:** 20.03.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.015

Согласно современным представлениям, эффективность программы ЭКО в основном зависит от двух факторов: способности эмбриона к внутриматочной nidации (эмбриональный фактор) и качества эндометрия (эндометриальный фактор) [1]. Каждый из этих факторов

напрямую зависит от овариального резерва. Так, при сниженном овариальном резерве отмечается тенденция к ухудшению качества ооцитов [2] и изменению доплерометрических показателей, отражающих снижение внутриматочной перфузии. В связи с тем, что в

исследовании изучали кровоснабжение матки, а в циклах ЭКО переносили только эмбрионы хорошего качества на 5е сутки, внимание было обращено именно на эндометриальный фактор.

В отчете Российской ассоциации репродукции человека (РАРЧ) за 2013 г. показано, что замена собственных эмбрионов на донорские у пациенток после 40 лет в протоколе криоконсервации увеличивает эффективность циклов ЭКО всего на 4,8% [3]. Представленные данные косвенно указывают на то, что повышение эффективности программ ЭКО у пациенток со сниженным овариальным резервом в значительной степени зависит от эндометриального фактора. В связи с этим оценка состояния рецептивности эндометрия и поиск подходов к ее повышению являются актуальной сферой исследования. 3D-УЗИ с функцией энергетической доплерографии может быть отличной неинвазивной методикой, по результатам которой можно косвенно судить о рецептивности эндометрия [4, 5].

Пролиферация и дифференциация эндометрия контролируются стероидными гормонами яичника, отвечающими за активный ангиогенез [6], который играет важнейшую роль в росте эндометрия и последующей имплантации эмбриона [7, 8]. Адекватное кровоснабжение эндометрия и субэндометриальной зоны рассматривается как необходимое условие для успешной имплантации.

В ходе исследования, проведенного в 2012 г. [8], авторы сравнивали кровоснабжение субэндометриальной зоны с помощью 2D- и 3D-УЗИ и полученные результаты соотносили с данными о рецептивности эндометрия, определяющей «окно имплантации», полученными с помощью пайпель-биопсии. Было выявлено, что 3D-УЗИ по сравнению с 2D-УЗИ обладает большей прогностической способностью и является более точным методом, с помощью которого возможно прогнозирование состояния эндометрия. На отсутствие зависимости между результатами 2D-УЗИ и эффективностью циклов ЭКО указывали и другие исследователи [9].

Работ, посвященных оценке объемного кровотока матки у пациенток с различным овариальным резервом, определяемого для прогнозирования частоты наступления беременности в циклах ЭКО и ПЭ, недостаточно.

Целью исследования было прогнозирование вероятности наступления беременности у пациенток с различным овариальным резервом в цикле ЭКО на основании определения объемного кровотока в матке в день переноса эмбриона с помощью 3D-УЗИ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе отделения репродукции ЭКО Центра планирования семьи и репродукции (ЦПСИР) с 2015 по 2017 г.

В рамках исследования проводили проспективный анализ лечебных стимулированных циклов стандартных программ ЭКО у 56 пациенток с различным овариальным резервом, в ходе которых выполняли перенос на 5-е сутки не более двух эмбрионов на стадии бластоцисты. В зависимости от эффективности проведенного цикла выделили две группы. Первую составили пациентки после ЭКО с наступившей беременностью (21 пациентка), вторую — те, у кого после лечебного цикла беременность не наступила (35 пациенток). Среди пациенток с наступившей беременностью у 13 (61,9%) был трубно-перитонеальный фактор бесплодия, у 8 (38,1%) —

сниженный овариальный резерв. У 23 (65,7%) пациенток с неэффективным циклом ЭКО был трубно-перитонеальный фактор бесплодия, у 12 (34,2%) — сниженный овариальный резерв.

Критерии включения: возраст более 30 лет и менее 40 лет; фактор бесплодия — сниженный овариальный резерв и трубно-перитонеальный фактор.

Критерии исключения: наличие объемных образований яичников, миомы матки, аденомиоз; фактор бесплодия у партнера; проведенный курс терапии, направленной на улучшение маточного кровотока.

О степени выраженности снижения овариального резерва судили по уровню фолликулостимулирующего (ФСГ) и антимюллерова гормона (АМГ), количеству антральных фолликулов до 10 мм в диаметре, выявленных при УЗИ на 2–3-й день лечебного цикла. Если уровень ФСГ превышал 8 МЕ/л, уровень АМГ был ниже 1 нг/мл и количество полученных ооцитов после трансвагинальной пункции достигало 3 и менее, то овариальный резерв считали сниженным.

Для стимуляции яичников в циклах стандартных программ ЭКО использовали протокол с антагонистом гонадотропин-релизинг гормона. Стимуляцию овуляции проводили рекомбинантным фолликулостимулирующим гормоном (рФСГ).

Подбор стартовой дозы ФСГ, входящей в состав препаратов для стимуляции суперовуляции (от 75 до 275 МЕ/сут.), осуществляли индивидуально в зависимости от возраста, индекса массы тела (ИМТ), уровня ФСГ и АМГ, а также на основании ответа яичников на предыдущие циклы стимуляции. Контроль за индуцированным фолликулогенезом проводили с помощью УЗИ. При достижении лидирующим фолликулом диаметра 18–20 мм вводили триггер овуляции хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) и через 34–36 ч выполняли трансвагинальную пункцию фолликулов диаметром больше 15 мм. Выделение ооцитов, их инсеминацию, культивирование и ПЭ, а также поддержку лютеиновой фазы препаратами прогестеронового ряда в посттрансферном периоде выполняли в соответствии с существующими стандартными рекомендациями [2].

В день переноса эмбриона осуществляли 3D-реконструкцию матки с использованием функции энергетической доплерографии. УЗИ проводили на приборе Voluson 730 Expert (GE Healthcare, Austria) с использованием объемного трансвагинального датчика с частотой 5–9 МГц. Так как от различной частоты параметры кровотока у одной и той же пациентки меняются, нами были установлены следующие настройки аппарата: Gn — 9,0; Frq — low; Qual — norm; WMF — low1; PRF — 0,9 кГц.

Для 3D-сканирования получали 2D-изображение с заданным на нем окном объемной реконструкции. Первичное 2D-изображение соответствовало центральной плоскости сканируемого объема [10, 11], а само сканирование разворачивали от одной его границы до другой. Угол захвата объема составлял 120° с последующим шагом обведения 15° и не более, поскольку при малой дискретности сосуда, расположенные рядом с маткой, могут попадать в объем реконструкции объекта.

При помощи прикладной программы VOCAL в ручном режиме производили обводку контура матки и эндометрия. Оценку особенностей васкуляризации эндометрия проводили двумя методами. Первый включал в себя обводку эндометрия по границе базального слоя. При втором методе граница контура обводки находилась на 5 мм

кнаружи от базального слоя, в области субэндометрия — включая его, для захвата не только базальных, но и радиальных артерий [12]. Погрешностью при построении считали зазубренный контур в некоторых срезах органа и в целом, несмотря на корректную обводку каждого среза. После проведенных манипуляций автоматически рассчитывали объем матки, эндометрия и субэндометрия. При построении гистограмм определяли такие показатели, как индекс васкуляризации (*vascularization index, VI*), характеризующий процентное соотношение сосудов в определенном объеме ткани; индекс потока (*flow index, FI*), который показывает объем крови, перемещающейся в сосудах во время исследования; васкуляризационно-потоковый индекс (*vascularization-flow index, VFI*), являющийся показателем перфузии органа.

Полученные результаты обрабатывали с использованием пакетов прикладных программ Excel 7.0, Statistica 6.0. Различия частот анализируемого признака при парных сравнениях считали достоверным при уровне значимости $p < 0,05$. Для обработки данных использовали также ROC-анализ с определением площади под кривой. Чем выше значение площади под ROC-кривой, тем лучше качество модели: 0,9–1,0 — отличное; 0,8–0,9 — очень хорошее; 0,7–0,8 — хорошее; 0,6–0,7 — среднее; 0,5–0,6 — неудовлетворительное.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Возраст пациенток варьировал от 30 до 42 лет ($34,27 \pm 3,98$ года). Среди них до 35 лет было 17 пациенток, от 35 до 42 лет — 39 пациенток. Возраст пациенток, у которых после ПЭ наступила беременность (I группа), составил в среднем $34,27 \pm 3,98$ года. При ненаступившей беременности (II группа) — $36,00 \pm 3,74$ года ($p > 0,05$). Несмотря на тенденцию повышения возраста у пациенток с неэффективным циклом по сравнению с эффективным,

особенно у пациенток со сниженным овариальным резервом, достоверных различий этого параметра не отмечено (табл. 1).

Благодаря тщательному отбору пациенток, проходящих лечение методом вспомогательной репродуктивной технологии (ВРТ), количество случаев возникновения экстрагенитальной патологии не выходило за рамки общепопуляционных.

При оценке характера гинекологической патологии отмечалось относительно большое количество случаев оперативных вмешательств (см. табл. 1) на яичниках (40%) у пациенток со сниженным овариальным резервом и отсутствием эффекта от ЭКО. Показаниями к кистэктомии было наличие цистаденомы различных размеров у 5 пациенток (31,2%), эндометриоидных кист — у 11 (68,8%).

При неудачной попытке ЭКО как при сниженном, так и при нормальном овариальном резерве у половины пациенток в анамнезе наблюдалось раздельное диагностическое выскабливание слизистой матки по поводу гиперпластических процессов в эндометрии (17–48,6%); из них у 14 пациенток — по поводу полипа эндометрия и у 3 пациенток — по поводу гиперплазии эндометрия. При эффективном цикле случаи патологии эндометрия встречались в 1,7 раза реже (см. табл. 1).

Стаж бесплодия варьировал в широких границах от 1 года до 11 лет. У пациенток со сниженным овариальным резервом, как в I группе, так и во II, он был относительно выше, чем у пациенток с нормальным овариальным резервом, но достоверно не отличался (см. табл. 1).

У пациенток с наступившей беременностью первичное бесплодие было отмечено у большинства. При неэффективном цикле ЭКО первичное бесплодие тоже было у большинства пациенток (у 20–57,1%).

Уровни ФСГ и АМГ, определяющие функцию яичников, достоверно различались в зависимости от овариального резерва. Так, низкий уровень АМГ и высокий уровень

Таблица 1. Характеристика пациенток при различном овариальном резерве и эффективности ЭКО

	Эффективный цикл (n = 21)		Неэффективный цикл (n = 35)		p
	Хороший овариальный резерв (n = 13) p ¹	Сниженный овариальный резерв (n = 8) p ²	Хороший овариальный резерв (n = 23) p ³	Сниженный овариальный резерв (n = 12) p ⁴	
Возраст (лет)	33,27 ± 4,98	35,45 ± 2,98	35,09 ± 3,46	37,02 ± 2,87	–
Индекс массы тела	24,36 ± 1,98	24,76 ± 1,43	25,02 ± 1,17	25,32 ± 1,87	–
Стаж бесплодия (лет)	4,16 ± 2,54	5,26 ± 3,54	5,98 ± 2,07	5,41 ± 3,07	–
Первичное бесплодие	3 14,3%	6 28,6%	5 14,3%	10 28,6%	–
Вторичное бесплодие	10 47,6%	2 9,5%	18 51,4%	2 5,7%	–
Уровень ФСГ (мМЕ/мл)	6,8 ± 1,56	11,99 ± 7,03	7,18 ± 1,79	12,29 ± 5,99	p ¹ /p ² = 0,001* p ³ /p ⁴ = 0,002*
Уровень АМГ (нг/мл)	3,26 ± 1,27	0,61 ± 0,42	3,57 ± 2,43	0,65 ± 0,37	p ¹ /p ³ = 0,021* p ² /p ⁴ = 0,001*
Доза рФСГ (МЕ)	2202,5 ± 986,8	1602,9 ± 796,8	2309,2 ± 862,2	1809,2 ± 987,8	–
Толщина эндометрия в день переноса (мм)	10,4 ± 2,6	10,60 ± 1,94	8,4 ± 0,9	8,31 ± 1,28	p ¹ /p ³ = 0,05* p ² /p ⁴ = 0,003*
Количество перенесенных эмбрионов	1,49 ± 0,21	1,59 ± 0,29	1,76 ± 0,68	1,32 ± 0,43	–
Операции на яичниках	1 4,8%	3 14,9%	5 14,9%	7 40%	–
Количество случаев патологии эндометрия в анамнезе	4 19,0%	2 9,5%	9 25,7%	8 22,9%	–

Примечание: * — показатели с достоверными различиями.

ФСГ отмечался у пациенток со сниженным овариальным резервом (см. табл. 1).

Дозы рФСГ и количество перенесенных эмбрионов у пациенток в обеих группах достоверно не различались.

На 5-й день после трансвагинальной пункции перед переносом эмбриона были осуществлены 2D- и 3D-УЗИ с функцией энергетической доплерографии.

В нашем исследовании при оценке толщины эндометрия в день переноса эмбриона у пациенток с наступившей беременностью данный параметр варьировал от 8,0 до 14,5 мм. Самый большой показатель толщины эндометрия (14,5 мм) отмечен после переноса эмбриона пациентке, у которой впоследствии родилась двойня. При неэффективных циклах ЭКО толщина эндометрия варьировала от 7,0 до 10,6 мм. При сравнении зависимости данного параметра от функций яичника отмечено, что достоверные различия значений между группами с эффективным и неэффективным циклом ЭКО были у пациенток как со сниженным, так и с хорошим овариальным резервом ($p = 0,003$; $p = 0,05$) (см. табл. 1).

Следовательно, значение толщины эндометрия в день переноса эмбриона может служить достаточно информативным критерием эффективности цикла ЭКО как при хорошем овариальном резерве, так и при сниженном.

При исследовании объема матки с помощью 3D-УЗИ в группе с наступившей беременностью (I группа) размеры ее варьировали от 31,7 до 83,3 мм³, в группе с неэффективным циклом — от 21,0 до 90,3 мм³. По результатам анализа, обнаружена тенденция к изменению объема матки в зависимости от наличия родов в анамнезе. Так, при объеме матки более 58 мм³ у 87,5% пациенток в I группе и у 65,7% во II группе в анамнезе имелись роды. Не отмечена зависимость объема матки от овариального резерва и эффективности цикла ЭКО ($p > 0,05$) (табл. 2).

Среднее значение объема субэндометриальной зоны при эффективном цикле ЭКО варьировало от 3,5 до 13,9 мм³. Показатели объема у женщин с наступившей беременностью изменялись от 4 до 14 мм³. Достоверных различий средних значений этого показателя в зависимости от эффективности циклов ЭКО и овариального резерва не отмечено ($p > 0,05$) (табл. 2).

Таким образом, проведенное исследование показало, что значения объемов миометрия и субэндометриальной зоны значимости в прогнозировании эффективности циклов ЭКО как при сниженном, так и при нормальном овариальном резерве не имеют.

В современной литературе имеются данные о необходимости изучения объема эндометрия, учитывая большую корреляцию его показателей с исходами циклов ЭКО. Рекомендуется учитывать значения именно объема

эндометрия в цикле ЭКО, а не его толщину (М-эхо), в связи с большой субъективностью второго показателя [12]. В нашем исследовании выявлено, что как при сниженном, так и при нормальном овариальном резерве, объем эндометрия у пациенток с эффективным циклом ЭКО был достоверно больше, чем у пациенток с наступившей беременностью ($p = 0,003$) (см. табл. 2). Так, при эффективном цикле ЭКО и нормальном овариальном резерве данный параметр был в 1,4 и 1,7 раза выше, чем при неэффективном ($p = 0,004$, $p = 0,008$) (см. табл. 2). В связи с полученными данными объем эндометрия можно использовать в качестве критерия эффективности цикла ЭКО.

При индивидуальном анализе выявлено, что у пациенток, имеющих в анамнезе раздельное диагностическое выскабливание слизистой матки, в день переноса эмбриона отмечались относительно низкие значения объема эндометрия как при эффективном, так и при неэффективном цикле, в отличие от пациенток без оперативного вмешательства.

Для прогнозирования эффективности циклов ЭКО применяли метод энергетической доплерографии с оценкой низкоскоростных потоков крови, которые характерны для миометрия и эндометрия. По некоторым данным, именно эта методика увеличивает количество визуализируемых сосудов с низкой скоростью кровотока [11].

При оценке индексов кровотока, полученных в ходе построения гистограмм (табл. 3), выявлена следующая закономерность: индексы объемного кровотока в миометрии и субэндометрии были достоверно выше у пациенток с наступившей беременностью после ПЭ. Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что индекс васкуляризации (VI) и васкуляризационно-потоковый индекс (VFI) в миометрии при эффективном цикле ЭКО были в 1,6 и 2,0 раза выше, чем при отсутствии эффекта от ЭКО. Аналогичные изменения отмечены при анализе васкуляризации субэндометриальной зоны. Наибольшие различия в значениях имеют эти же параметры VI и VFI: они в 2,6 и 2,5 раза выше у пациенток с наступившей беременностью после ПЭ.

При сравнении изменений параметров кровотока у пациенток в зависимости от овариального резерва установлено, что при неэффективном цикле ЭКО и сниженном овариальном резерве VI и VFI в миометрии были в 1,6 и 1,5 раза, а VFI в субэндометриальной зоне в 2,5 раза ниже, чем при нормальном овариальном резерве и неэффективном цикле ($p < 0,05$) (табл. 3). Указанное свидетельствует о пониженном кровенаполнении матки у пациенток со сниженным овариальным резервом в отличие от женщин с адекватной функцией яичников.

Таблица 2. Показатели объема миометрия, субэндометриальной зоны и эндометрия, полученные при 3D-УЗИ

	Эффективный цикл (n = 21)		Неэффективный цикл (n = 35)		p
	Хороший овариальный резерв (мм ³) (n = 13) p ¹	Сниженный овариальный резерв (мм ³) (n = 8) p ²	Хороший овариальный резерв (мм ³) (n = 25) p ³	Сниженный овариальный резерв (мм ³) (n = 12) p ⁴	
Объем миометрия	49,4 ± 5,01	47,2 ± 4,98	49,2 ± 3,67	48,6 ± 5,12	–
Объем субэндометрия	10,0 ± 1,1	9,8 ± 0,8	8,9 ± 0,8	8,7 ± 0,7	–
Объем эндометрия	2,53 ± 0,19	1,38 ± 0,31	1,79 ± 0,38	0,82 ± 0,25	p ¹ /p ² = 0,004* p ³ /p ⁴ = 0,008* p ¹ /p ³ = 0,05* p ² /p ⁴ = 0,02*

Примечание: * — показатели с достоверными различиями.

Таблица 3. Показатели гемодинамики в матке при различном овариальном резерве и эффективность ЭКО

Группы	Эффективность/ Параметры 3D-УЗИ	В матке			В субэндометрии			В эндометрии		
		VI	FI	VFI	VI	FI	VFI	VI	FI	VFI
Нормальный овариальный резерв	Эффективный цикл (n = 13) p ¹	11,41 ± 2,19	16,16 ± 2,90	1,77 ± 0,35	6,13 ± 4,23	10,0 ± 1,17	0,92 ± 0,64	3,41 ± 2,82	11,60 ± 1,61	0,32 ± 0,33
	Неэффективный цикл (n = 25) p ²	7,45 ± 0,97	12,75 ± 1,68	0,94 ± 0,05	3,19 ± 2,57	10,55 ± 1,90	0,25 ± 0,15	2,5 ± 2,22	11,38 ± 2,76	0,27 ± 0,21
Сниженный овариальный резерв	Эффективный цикл (n = 8) p ³	10,56 ± 2,57	17,68 ± 3,44	1,92 ± 0,75	3,52 ± 1,09	11,12 ± 1,03	0,39 ± 0,16	2,40 ± 1,84	10,69 ± 1,68	0,22 ± 0,20
	Неэффективный цикл (n = 12) p ⁴	4,47 ± 2,30	14,05 ± 3,32	0,62 ± 0,28	1,23 ± 1,27	8,61 ± 3,95	0,10 ± 0,08	1,82 ± 1,49	11,17 ± 2,16	0,19 ± 0,16
p		p ¹ /p ² = 0,007** p ³ /p ⁴ = 0,003** p ¹ /p ³ = 0,62 p ² /p ⁴ = 0,014*	p ¹ /p ² = 0,06 p ³ /p ⁴ = 0,35 p ¹ /p ³ = 0,52 p ² /p ⁴ = 0,41	p ¹ /p ² = 0,23 p ³ /p ⁴ = 0,009** p ¹ /p ³ = 0,78 p ² /p ⁴ = 0,011*	p ¹ /p ² = 0,24 p ³ /p ⁴ = 0,014* p ¹ /p ³ = 0,27 p ² /p ⁴ = 0,12	p ¹ /p ² = 0,58 p ³ /p ⁴ = 0,18 p ¹ /p ³ = 0,19 p ² /p ⁴ = 0,30	p ¹ /p ² = 0,013* p ³ /p ⁴ = 0,007** p ¹ /p ³ = 0,12 p ² /p ⁴ = 0,04*	p ¹ /p ² = 0,34 p ³ /p ⁴ = 0,82 p ¹ /p ³ = 0,21 p ² /p ⁴ = 0,41	p ¹ /p ² = 0,83 p ³ /p ⁴ = 0,65 p ¹ /p ³ = 0,37 p ² /p ⁴ = 0,85	p ¹ /p ² = 0,57 p ³ /p ⁴ = 0,77 p ¹ /p ³ = 0,57 p ² /p ⁴ = 0,32

Примечания: * — показатели с достоверными различиями при p < 0,05; ** — показатели с достоверными различиями при p < 0,01.

Напротив, при эффективном цикле ЭКО, сравнение пациенток с различным овариальным резервом не выявило различий в параметрах кровотока как при сниженном, так и при нормальном овариальном резерве.

Для сравнения двух методов оценки кровоснабжения эндометрия (рис. 1) (с захватом субэндометриальной зоны и без) проводили ROC-анализ (рис. 2), в ходе которого было выявлено, что при обведении эндометрия строго по базальному контуру (кровоток в эндометрии) зависимости показателей кровотока и эффективности циклов ЭКО не было получено (рис. 2 а) (площадь под кривой для каждого измеренного параметра: для VI — 0,49; для FI — 0,50; для VFI — 0,49).

При обведении контура на 5 мм кнаружи от базального слоя с захватом субэндометриальной зоны отмечена зависимость между параметрами кровотока и эффективностью циклов ЭКО (рис. 2 б) (площадь под кривой для каждого измеренного параметра: для VI — 0,88; для FI — 0,66; для VFI — 0,91).

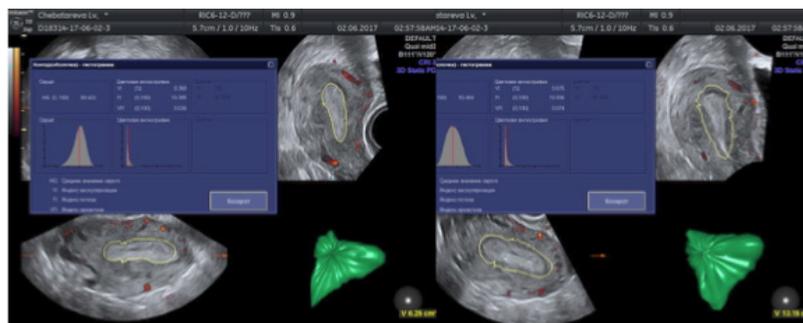
При анализе полученных нами данных с помощью 2D- и 3D-УЗИ выделены основные параметры, имеющие достоверную корреляцию с эффективностью цикла ЭКО независимо от овариального резерва: объем эндометрия, индекс VI миометрия и VFI субэндометрия. Прогностическая значимость данных показателей представлена с помощью ROC-кривой (рис. 3). Чувствительность 74,8%,

специфичность 60,6%, площадь под кривой 0,851 для объема эндометрия; те же показатели равные 86,4%, 69,4%, 0,857 соответственно — для VI миометрия, те же показатели равные 90,4%, 79,4%, 0,916 соответственно — для VFI субэндометриальной зоны.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При 2D-УЗИ определяли толщину эндометрия (М-эхо). Данные о минимально допустимой толщине эндометрия, необходимой для успешного наступления беременности, в литературе неоднозначны. Большинство исследователей отмечали, что при значении толщины эндометрия менее 7 мм беременность после переноса эмбриона не наступала [7, 13, 14]. Однако в литературе имеются указания о наступлении беременности при значении 6 мм и даже 4 мм [15]. При этом толщина эндометрия свыше 14 мм ассоциирована с высоким риском потери беременности [7].

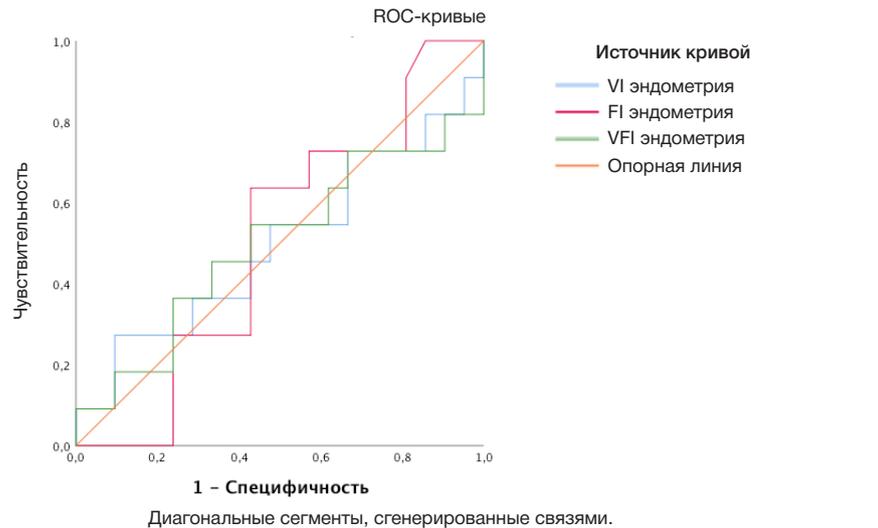
В ходе проведенного нами исследования выявлено, что при 2D-УЗИ показатели толщины эндометрия у пациенток с различным овариальным резервом зависели от эффективности циклов ЭКО. Однако при нормальном овариальном резерве различия имели большую достоверность (p = 0,003) чем при сниженном овариальном резерве (p = 0,05). В литературе имеются данные об отсутствии зависимости между эффективностью циклов



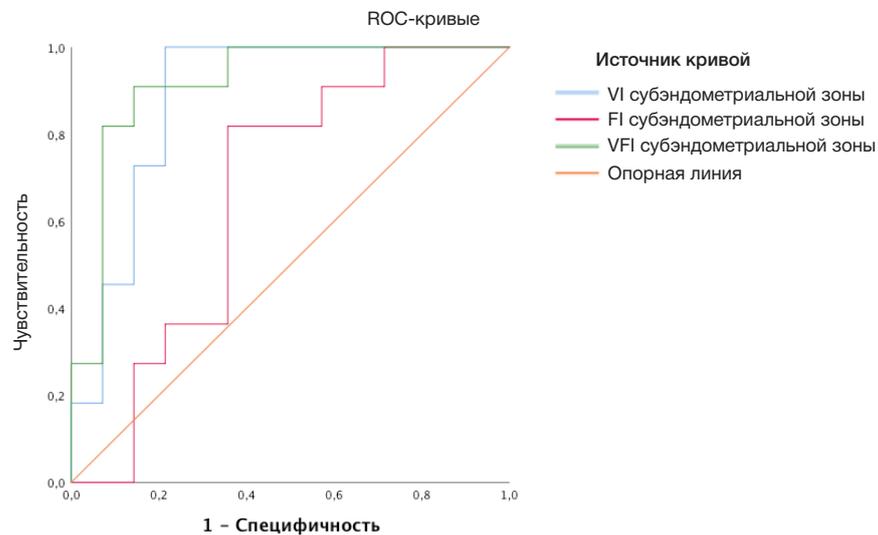
А Кровоснабжение в эндометрии

Б Кровоснабжение в эндометрии с захватом субэндометриальной зоны

Рис. 1. Варианты измерения кровоснабжения в эндометрии и субэндометриальной зоне



А Кровоснабжение в эндометрии



Б Кровоснабжение субэндометриальной зоны

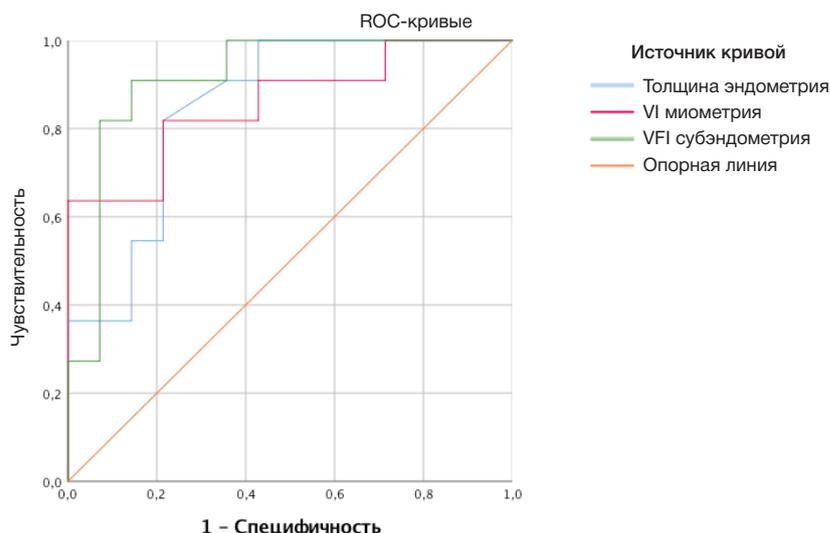
Рис. 2. ROC-анализ зависимости эффективности циклов ЭКО и кровоснабжения эндометрия (А) и субэндометриальной зоны (Б)

ЭКО и толщиной эндометрия [14]. Сообщалось также, что у пациенток старше 40 лет отмечается тенденция к более низким показателям толщины эндометрия, которая связана со снижением уровня эстрадиола [12]. Ряд авторов утверждают, что толщина эндометрия носит субъективный характер, в связи с чем использование 3D-УЗИ с определением объема эндометрия более показательны и позволяет обнаружить зависимость между этим параметром и эффективностью циклов ЭКО [8]. В нашем исследовании при 3D-УЗИ показатели объема эндометрия также имели достоверные различия в зависимости от эффективности цикла ($p = 0,05$; $p = 0,02$). При сравнении значений объема эндометрия у забеременевших пациенток с различным овариальным резервом отмечена достоверная разница показателей ($p = 0,004$), в то время как при измерении толщины эндометрия данных различий не обнаружено.

Немаловажное значение следует придавать особенностям внутриматочного кровотока. В результате большого метанализа показано, что по данным кровоснабжения в субэндометриальной зоне и эндометрии можно косвенно судить о рецептивности эндометрия [5].

Как известно, кровоснабжение эндометрия осуществляется, в основном, за счет расположенных в нем спиральных артерий, а последние являются продолжением базальных артерий, располагающихся в субэндометрии [11]. Определение параметров кровотока в эндометрии с захватом субэндометриальной зоны (субэндометрий) наиболее показательны поскольку отражает интенсивность кровотока дополнительно в дугообразной артерии и отходящих от нее радиальных ветвях.

Учитывая, что в циклах ЭКО в день переноса эмбриона отсутствует возможность для исследования рецептивности ткани с помощью инвазивных методик в связи с травматизацией эндометрия, использование неинвазивных методов оказывается предпочтительным. При исследовании параметров кровотока в матке и субэндометрии выявлены достоверные различия для пациенток независимо от овариального резерва в показателях VI миометрия ($p = 0,007$ для пациенток с нормальным овариальным резервом; $p = 0,003$ для пациенток со сниженным овариальным резервом) и в показателях VFI субэндометрия ($p = 0,013$ для пациенток с нормальным овариальным резервом; $p = 0,007$ для



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рис. 3. ROC-анализ зависимости эффективности ЭКО и показателей объема эндометрия, VI в миометрии и VFI в субэндометрии

пациенток со сниженным овариальным резервом). Самые низкие параметры кровотоков были отмечены у пациенток с низким овариальным резервом и неэффективным циклом ЭКО. Считается, что снижение показателей кровотока при низком овариальном резерве связаны с нарушением роста сосудов функционального слоя эндометрия из-за недостаточного влияния эстрогенов в течение пролиферативной фазы [16].

Подтверждением этих данных могут быть результаты одного из исследований [17], свидетельствующие о том, что содержание эстрогенов в сыворотке крови имеет достоверную связь с интенсивностью маточного кровотока в циклах ЭКО с применением а-ГнРГ и гонадотропинов. Доказано, что при преждевременном истощении функции яичников проведение заместительной гормональной терапии значительно улучшает доплерометрические характеристики кровотока в матке [18].

Таким образом, использование 3D-УЗИ с функцией энергетической доплерографии в день переноса эмбриона позволяет косвенно судить о степени выраженности рецептивности эндометрия, что согласуется с данными других авторов [5], а также может использоваться в качестве прогностических критериев для определения вероятности наступления беременности после переноса эмбриона в цикле ЭКО.

Информация о показателях кровотока в миометрии и субэндометриальной зоны, а также объем эндометрия

позволит избежать заведомо нерезультативных переносов эмбриона. Пациенткам со сниженным овариальным резервом с целью повышения эффективности переноса эмбриона целесообразно исследование кровоснабжения матки и при отклонениях от нормативных показателей рекомендовать проведение терапии, направленной на улучшение маточной перфузии на этапе прегравидарной подготовки.

ВЫВОДЫ

В нашем исследовании показано, что 3D-УЗИ с функцией энергетической доплерографии является объективным методом исследования кровоснабжения матки в день переноса эмбриона у пациенток в циклах ЭКО. Для прогнозирования эффективности циклов ЭКО предпочтение следует отдавать параметрам кровотока в миометрии и в субэндометриальном слое. Изучение кровотока в базальном слое эндометрия в нашем исследовании не выявило зависимости с эффективностью цикла ЭКО. Измерение объема эндометрия с помощью 3D-УЗИ в сравнении с определением толщины эндометрия при 2D-УЗИ более информативно и прогностически значимо. Учитывая крайне низкие показатели кровотока при сниженном овариальном резерве и неэффективном цикле ЭКО, 3D-УЗИ возможно рекомендовать в качестве обязательной процедуры перед переносом эмбриона в цикле ЭКО у данных пациенток.

Литература

1. Аншина М. Б., Исакова Э. В., Калинина Е. Анат., Калинина Е. Андр., Корсак В. С., Краснополянская К. В. и др. Применение эстрогенов в программах ВРТ. Научно-практические рекомендации. М.: Российская ассоциация репродукции человека. 2015, 80 с.
2. Назаренко Т. А., Краснополянская К. В. «Бедный ответ». Тактика ведения пациенток со сниженной реакцией на стимуляцию гонадотропинами в программах ЭКО. М.: МЕДпресс-информ; 2013, 80 с.
3. Корсак В. С., Смирнова А. А., Шурыгина О. В. ВРТ в России. Отчет за 2013 г. Проблемы репродукции. 2015; 21 (6): 17–19.
4. Mishra VV, Agarwal R, Sharma U, Aggarwal R, Choudhary S, Bandwal P. Endometrial and Subendometrial Vasculature by Three-Dimensional (3D) Power Doppler and Its Correlation with Pregnancy Outcome in Frozen Embryo Transfer (FET) Cycles. J of Obstetrics and Gynaecology of India. 2016; 66 (Suppl 1): 521–527. DOI: 10.1007/s13224-016-0871-5.
5. Jianing Wang, Fei Xia, Ying Zhou, Xuedong Wei, Yanyan Zhuang, Yingxue Huang. Association Between Endometrial/Subendometrial Vasculature and Embryo Transfer Outcome: A Meta-analysis and Subgroup Analysis. J Ultrasound Med. 2018 Jan; 37 (1): 149-163. DOI: 10.1002/jum.14319. Epub 2017 Jul 17.
6. Lecce G, Meduri G, Ancelin M. Presence of estrogen receptor bin the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells // J Clin Endocrinol.

- Metab. 2001; 86: 1379–86.
7. Amir W, Micha B, Ariel H, Liat LG, Jehoshua D, Adrian S. Predicting factors for endometrial thickness during treatment with assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2007; 87 (4): 799–804.
 8. Kalmantis K, Loutradis D, Lymperopoulos E, Beretsos P, Bletsas R, Antsaklis A. Three Dimensional Power Doppler evaluation of human endometrium after administration of oxytocine receptor antagonist (OTRa) in an IVF program., *Arch Gynecol Obstet*. 2012 Jan; 285 (1): 265–70. DOI: 10.1007/s00404-011-2019-2. Epub 2011 Aug 7.
 9. Prasad S, Goyal R, Kumar Y, et al. The Relationship Between Uterine Artery two-dimensional Color Doppler Measurement and Pregnancy Outcome: A Prospective Observational Study. *Journal of Reproduction & Infertility*. 2017; 18 (2): 251–6.
 10. Крылова Ю. С., Кветной И. М., Айламазян Э. К. Рецептивность эндометрия: молекулярные механизмы регуляции имплантации. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2013; 62 (2): 63–74. DOI: <http://dx.doi.org/10.17816/JOWD62263-74>.
 11. Озерская И. А. Атлас гинекологической ультразвуковой нормы. М.: Видар-М; 2010. 225 с.
 12. Ari Kim, Hyuk Jung, Won June Choi, Sung Nam Hong, Heung Yeol Kim. Detection of endometrial and subendometrial vasculature on the day of embryo transfer and prediction of pregnancy during fresh in vitro fertilization cycles Taiwanese. *Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2014; 53 (3): 360–5.
 13. Краснополянская К. В., Назаренко Т. А., Сесина Н. И., Ершова И. Ю., Александрова В. Р. Результаты программ ЭКО с донорскими ооцитами у пациенток с ультразвуковыми признаками “тонкого” эндометрия. *Медицинский алфавит*. М.: Альфмед. 2017; 1 (12) (309) : 34–8.
 14. Kasius A, Smit JG, Torrance HL et al. Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2014; 20 (4): 530–41.
 15. Weiss NS, van Vliet MN, Limpens J, Hompes PGA et al. Endometrial thickness in women undergoing IUI with ovarian stimulation. How thick is too thin? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2017; 32 (5): 1009–18.
 16. Jayaprakasan K, Hopkisson JF, Campbell BK, Clewes J, Johnson IR, Raine-Fenning NJ. Quantification of the effect of pituitary down-regulation on 3D ultrasound predictors of ovarian response. *Human Reproduction*. 2008; 23 (7): 1538–44.
 17. Bassil S. Changes in endometrial thickness, width, length and pattern in predicting pregnancy outcome during ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001 Sep; 18 (3): 258–63.
 18. Mayra PR, Rosalina VL, López G, Iruretagoyena J, Magness R. Regulation of uterine blood flow. I. Functions of estrogen and estrogen receptor α/β in the uterine vascular endothelium during pregnancy. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2014; 79 (2): 129–39.

References

1. Anshina MB, Isakova EHV, Kalinina EAnat, Kalinina EAndr, Korsak VS, Krasnopol'skaya KV i dr. Priemenie estrogenov v programmach WPT. *Nachno-practicheskie rekomendacii*. М.: Rossiyskaja associaciya reprodukcii sheloveka. 2015; 80 s.
2. Nazarenko TA, Krasnopol'skaya KV. «Poor response.» Tactica vedenija pacientok so snijennoy reacciej a stimuljaciju gonadotropinami v programmach EKO. М. : MEDpress-inform, 2013. 80 s.
3. Korsak VS, Smirnova AA, Shurygina OV. VRT v Rossii. Otchet za 2013 g. *Problemy reprodukcii*. 2015; 21 (6): 17–19 .
4. Mishra VV, Agarwal R, Sharma U, Aggarwal R, Choudhary S, Bandwal P. Endometrial and Subendometrial Vascularity by Three-Dimensional (3D) Power Doppler and Its Correlation with Pregnancy Outcome in Frozen Embryo Transfer (FET) Cycles. *J of Obstetrics and Gynaecology of India*. 2016; 66 (Suppl 1): 521–527. DOI: 10.1007/s13224-016-0871-5.
5. Jianing Wang, Fei Xia, Ying Zhou, Xuedong Wei, Yanyan Zhuang, Yingxue Huang. Association Between Endometrial/Subendometrial Vasculature and Embryo Transfer Outcome: A Meta-analysis and Subgroup Analysis. *J Ultrasound Med*. 2018 Jan; 37 (1): 149–163. DOI: 10.1002/jum.14319. Epub 2017 Jul 17.
6. Lecce G, Meduri G, Ancelin M. Presence of estrogen receptor bin the human endometrium through the cycle: expression inglandular, stromal, and vascular cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 1379–86.
7. Amir W, Micha B, Ariel H, Liat LG, Jehoshua D, Adrian S. Predicting factors for endometrial thickness during treatment with assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2007; 87 (4): 799–804.
8. Kalmantis K, Loutradis D, Lymperopoulos E, Beretsos P, Bletsas R, Antsaklis A. Three Dimensional Power Doppler evaluation of human endometrium after administration of oxytocine receptor antagonist (OTRa) in an IVF program., *Arch Gynecol Obstet*. 2012 Jan; 285 (1): 265–70. DOI: 10.1007/s00404-011-2019-2. Epub 2011 Aug 7.
9. Prasad S, Goyal R, Kumar Y, et al. The Relationship Between Uterine Artery two-dimensional Color Doppler Measurement and Pregnancy Outcome: A Prospective Observational Study. *Journal of Reproduction & Infertility*. 2017; 18 (2): 251–6.
10. Krylova YuS, Kvetnoj IM, Ajlamazyan EK. Receptivnost' endometrija: moleculjarnye mehanizmy eguljacji implantacii. *J akusherstva i jenskich boleznej*. 2013; 62 (2): 63–74. DOI: <http://dx.doi.org/10.17816/JOWD62263-74>.
11. Ozerskaja IA. Atlas ginekologischeskoj ul'trazvukovoj normy. М.: Vidar-M; 2010. 225 s.
12. Ari Kim, Hyuk Jung, Won June Choi, Sung Nam Hong, Heung Yeol Kim. Detection of endometrial and subendometrial vasculature on the day of embryo transfer and prediction of pregnancy during fresh in vitro fertilization cycles Taiwanese. *Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2014; 53 (3): 360–5.
13. Krasnopol'skaya KV, Nazarenko TA, Sesina NI, Ershova IYu, Aleksandrova VR. Rezul'taty programmy EKO s donorskimi oocitami u pacientok s ul'trazvukovymi prinakami “tonkogo” endometrija. *Medicinskij alfavit*. М.: Al'famed. 2017; 1 (12) (309) : 34–8.
14. Kasius A, Smit JG, Torrance HL et al. Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2014; 20 (4): 530–41.
15. Weiss NS, van Vliet MN, Limpens J, Hompes PGA et al. Endometrial thickness in women undergoing IUI with ovarian stimulation. How thick is too thin? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2017; 32 (5): 1009–18.
16. Jayaprakasan K, Hopkisson JF, Campbell BK, Clewes J, Johnson IR, Raine-Fenning NJ. Quantification of the effect of pituitary down-regulation on 3D ultrasound predictors of ovarian response. *Human Reproduction*. 2008; 23 (7): 1538–44.
17. Bassil S. Changes in endometrial thickness, width, length and pattern in predicting pregnancy outcome during ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001 Sep; 18 (3): 258–63.
18. Mayra PR, Rosalina VL, López G, Iruretagoyena J, Magness R. Regulation of uterine blood flow. I. Functions of estrogen and estrogen receptor α/β in the uterine vascular endothelium during pregnancy. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2014; 79 (2): 129–39.

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНАЯ АТМОСФЕРНАЯ ПЛАЗМА В КОРРЕКЦИИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЖИ ЛИЦА

М. И. Шемшук¹, В. Н. Короткий¹✉, Д. Н. Серов², М. А. Кочетков², А. Г. Стенько³, Н. Г. Короткий¹

¹ Кафедра дерматовенерологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва

² Московский научно-практический центр дерматологии и косметологии, Москва

³ Институт пластической хирургии и косметологии, Москва

В антивозрастной терапии кожи лица стандартно используют ультрафиолетовое облучение, обработку поверхности кожи озоном и оксидом азота и воздействие электромагнитным полем. Низкотемпературная атмосферная плазма (НТП) способна оказать все эти воздействия. Целью работы было оценить эффективность НТП низкой интенсивности в качестве антивозрастной терапии кожи лица. Десяти пациенткам в возрасте 50–55 лет проводили исследование состояния кожи лица (Т-зону (центр лба), области «гусиных лапок» справа и слева) на аппарате DUB SkinScanner до начала применения НТП и через сутки после 10 процедур. После очищения кожи ее обработали НТП низкой интенсивности, которую генерировали в среде гелия в виде плазменного факела на приборе «ГЕЛИОС» («НПЦ Плазма», Россия). Время экспозиции НТП составило 5 мин на каждую зону, процедуры проводили через день. До лечения состояние кожи лица всех участниц соответствовало третьему морфотипу инволюционных изменений. Ультразвуковое исследование (УЗИ) всех зон показало значительную деформацию микрорельефа, утолщение эпидермиса при сохранении четкой границы эпидермиса и дермы, некоторое снижение толщины дермы с однородной эхоструктурой, смазанное отграничение дермы от гиподермы. После завершения курса у всех пациенток отмечено уменьшение деформации микрорельефа, средней толщины эпидермиса и ультразвуковой плотности эпидермиса и дермы, тенденция к увеличению средней толщины дермы. Наибольшие изменения коснулись морщин: наблюдалось их сглаживание в области «гусиных лапок». Таким образом, использование НТП вызвало уменьшение толщины рогового слоя эпидермиса, улучшение микроциркуляции и улучшение качества гидролипидной мантии кожи, что сопровождалось сглаживанием морщин. Нежелательных явлений со стороны кожного покрова и придатков кожи не было отмечено.

Ключевые слова: возрастные изменения кожи, низкотемпературная атмосферная плазма, морщины

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Николаевич Короткий
Ленинский пр-т, д. 117, корп. 6, г. Москва, 119571; vkbknk@gmail.com

Статья получена: 15.03.18 **Статья принята к печати:** 22.03.18

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.018

NON-THERMAL ATMOSPHERIC-PRESSURE PLASMA IN THE ANTI-AGE THERAPY OF FACIAL SKIN

Shemshuk MI¹, Korotky VN¹✉, Serov DN², Kochetkov MA², Stenko AG³, Korotky NG¹

¹ Department of Dermatology and Venerology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

² Moscow Research and Medical Center of Dermatology and Cosmetology, Moscow

³ Institute of Plastic Surgery and Cosmetology, Moscow

Traditionally, anti-age therapies employ ultraviolet radiation and exposure to ozone, nitric oxide and electromagnetic fields. Non-thermal atmospheric-pressure plasma (NTAPP) combines the effects of all those techniques. The aim of our study was to assess the feasibility of low-dose NTAPP application in anti-age facial skin therapy. Ten female patients aged 50 to 55 years were examined and three facial zones were chosen for the experiment: the T-zone (the central part of the forehead) and the “crow’s feet” areas on the right and left sides of the face. Ultrasonography was performed on the DUB SkinScanner before the treatment course and 24 hours after the last treatment. Cleansed skin was exposed to a low-energy NTAPP helium jet generated by the HELIOS system (Plasma Research and Production, Russia). Exposure time was 5 min per zone. Each participant received 10 NTAPP procedures on alternate days. Before therapy, the skin condition in all participants fitted into morphotype 3. Ultrasonography of the studied zones revealed a considerable deformation of the skin surface, a thickening of the epidermis with a distinct border between the epidermis and the dermis, a slight thinning of the dermis, its relatively homogenous echogenicity, and a blurred border between the dermis and the hypodermis. After the course was completed, all patients demonstrated an even skin surface, reduced epidermal thickness and reduced acoustic density of the epidermis and the dermis; the dermis tended to have above average thickness. The most significant changes were observed for the wrinkles: they became less pronounced in the “crow’s feet” area. Exposure to NTAPP caused the epidermal corneum to diminish in thickness; it also stimulated microcirculation and improved the condition of the hydrolipidic film, all of which ultimately led to the effacement of wrinkles. Treatment produced no adverse effects on the skin or its appendages.

Keywords: skin aging, non-thermal atmospheric-pressure plasma, wrinkles

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir Korotky
Leninsky 117, bl. 6, Moscow, 119571; vkbknk@gmail.com

Received: 15.03.18 **Accepted:** 22.03.18

DOI: 10.24075/brsmu.2018.018

Старение кожи — это первый видимый признак возрастных изменений, происходящих в организме. Различают два типа старения: хронологическое (внутреннее) и фотостарение (внешнее) [1]. Для хронологического старения характерно уменьшение общей толщины эпидермиса на 10–50%, атрофия шиповатого слоя, уменьшение в размерах и уплощение клеток базального слоя, снижение митотической активности базальных кератиноцитов, снижение скорости процессов обновления липидов, уплощение дермоэпидермального соединения, снижение количества и гетерогенности меланоцитов, снижение количества клеток Лангерганса. В дерме при этом типе старения снижается количество фибробластов, происходит атрофия межклеточного матрикса, дезинтеграция коллагеновых и эластических волокон и их уменьшение, откладывается амилоид. Все эти инволюционные изменения приводят к активации деформационных процессов и образованию морщин. Фотостарение — это неизбежное изменение кожи от воздействия агрессивной внешней среды, ее увядание. Симптомы увядания кожи появляются задолго до появления первых морщин. Морфофункциональные признаки фотостарения кожи принято разделять на изменения, происходящие в эпидермисе и дерме. Визуально фотостарение характеризуется возникновением сосудистых звездочек, пигментных пятен (лентиго).

Главными отличиями фотостарения от хронологического (истинного) старения являются утолщение эпидермиса за счет рогового слоя и изменение межклеточного вещества в дерме — накопление аморфного атипичного материала, состоящего из эластина. Стоит отметить, что способность дермы синтезировать коллаген и другие компоненты межклеточного вещества сохраняется, поэтому многие признаки фотостарения обратимы.

Внешне признаки старения имеют разные проявления, поэтому сейчас выделяют пять морфотипов старения [2]:

- 1 морфотип — «усталое лицо»: пастозность лица, опущение уголков рта;
- 2 морфотип — «морщинистое лицо»: выраженность морщин в уголках глаз (гусиные лапки), морщины верхнего и нижнего века, кисетные морщины в области верхней губы;
- 3 морфотип — старческая деформация лица и шеи: визуализируется избыток кожи в области верхнего и нижнего века, появление обвисших щек и двойного подбородка;
- 4 морфотип — комбинированный: к вышеперечисленным проявлениям присоединяются пониженная упругость, морщинистость и деформация;
- 5 морфотип — мускулистый: внешне отмечается складчатость верхнего и нижнего века, выраженность носогубной складки, сглаженность линии овала; чаще встречается у жителей Азии и Японии, у которых значительно развиты мышцы лица и незначительно выражена подкожно-жировая клетчатка.

С возрастом кожа истончается, становится бледной, ее эластичность и упругость снижаются, изменяется рельеф. Возрастные структурные перестройки затрагивают все зоны кожи: эпидермис, дерму и подкожно-жировую клетчатку. В коже молодых людей четко визуализируются структурные зоны, эпидермис имеет сосочковый рисунок, дерма плотная, подкожно-жировая клетчатка образует хорошо заметный слой [2]. Кожа пожилых истончается и утрачивает четкость структурной организации [2]. Сосочковый рисунок эпидермиса сглаживается, за счет

чего площадь контакта эпидермиса и дермы уменьшается [2]. Волокнистый каркас дермы рыхлый, наблюдаются признаки отека [2]. Визуализируются морщины, подкожно-жировая клетчатка склерозирована и в этой связи не имеет четких границ с дермой.

Возрастные изменения кожи лица и возможность коррекции инволюционных изменений интересуют не только пациентов, но и врачей-косметологов. В настоящее время для борьбы с возрастными изменениями кожи лица используют многочисленные терапевтические воздействия, в том числе специальные косметологические средства, химический пилинг, различные физиотерапевтические методы как в виде монотерапии, так и комбинированными [3–5]. Все они направлены на восстановление водно-липидной мантии кожи, водного баланса эпидермиса и дермы, а также на повышение микроциркуляции во всех слоях кожи, что сопровождается улучшением синтеза коллагеновых волокон [3]. Однако перечисленные меры имеют немало неприятных, порой грозных нежелательных явлений. При косметологическом уходе за стареющей кожей лица, шеи и области декольте нередко развиваются различные аллергические реакции [5], при химическом пилинге — покраснение, шелушение, отек и/или пигментация обработанной кожи [5], при физиотерапевтическом воздействии на кожу — появление демаркационной линии, нарушение пигментации кожи (гипер- или гипопигментация), рубцовые изменения, термические ожоги, болевые ощущения, атония кожи, электротравма [6]. В связи с этим поиск эффективных и безопасных методов воздействия на инволюционные изменения продолжается и по настоящее время. Так, в ряде экспериментов была показана способность «холодной» (низкотемпературной) атмосферной плазмы (НТП) при малой интенсивности воздействия улучшать трофику тканей, повысить способность структур кожи к регенерации [7–10].

Новым неинвазивным методом, объединяющим в себе одновременно и действие ультрафиолетового излучения (УФ), и обработку поверхности озоном и оксидом азота, и воздействие электромагнитным полем, является НТП [8–12]. Плазма в физическом смысле — это частично или полностью ионизированный газ, так называемое четвертое состояние материи. НТП генерируется путем воздействия электромагнитного поля на газ при атмосферном давлении. Когда поле достаточно сильное, газовые ионы генерируются путем выделения электронов из молекул газа. Свободные электроны ускоряются электромагнитным полем и направляются к аноду, могут сталкиваться с молекулами газа, генерируя больше ионов газа и свободных электронов (ударная ионизация), что, в свою очередь, способствует образованию дополнительных молекул газа и т. д., приводя к генерации газовой плазмы при атмосферном давлении. Помимо электрического магнитного поля, свойства такой плазмы зависят от давления газа, типа используемого газа и геометрии излучателя [12, 13]. НТП лишена основного недостатка других методов лечебного воздействия — высоких концентраций токсических веществ.

Основные действующие компоненты НТП — электроны, ионы, свободные радикалы и свет [13]. Свободные радикалы особенно важны в индукции физиологических функций клеток и тканей. Образующиеся под действием НТП активные формы кислорода и азота играют очень важную роль как в физиологических, так и патологических процессах, происходящих в различных клетках организма

[14–16]. В последнее десятилетие созданы различные приборы, генерирующие НТП [17, 18], изучены эффекты прямого ее действия на липиды, белки, нуклеиновые кислоты живых клеток и опосредованного действия на сигнальные клеточные пути [15, 19].

В последние годы НТП начала использоваться в регенеративной медицине. Низкоинтенсивное воздействие НТП усиливает рост и пролиферацию клеток, в то время как высокоинтенсивное воздействие может привести к апоптозу или некрозу клеток, что подтверждает дозозависимый эффект оксидативного стресса [13, 20, 22]. При изучении интенсивности НТП (количества энергии, которую НТП передает биологическим тканям) и ее воздействия на клетки млекопитающих было показано, что обработка НТП низкой интенсивности (не более $0,2 \text{ Дж/см}^2$) приводит к пролиферации клеток, НТП средней интенсивности ($0,2\text{--}0,6 \text{ Дж/см}^2$) не оказывает никакого воздействия на клетки млекопитающих, а НТП высокой интенсивности (более $0,6 \text{ Дж/см}^2$) вызывает апоптотическую гибель клеток [19, 22]. Опубликованы результаты многочисленных исследований как *ex vivo*, так и *in vivo* демонстрирующих антисептическое [22–28] и ранозаживляющее действие НТП [9, 10, 29, 30]. Использование НТП высокой интенсивности нашло свое место в онкологии [20, 31] и в эрадикации различных возбудителей [21–28], а низкой интенсивности — в регенеративной медицине [9, 10, 20, 29, 30].

В настоящей работе мы исследовали возможность использования НТП низкой интенсивности для улучшения состояния кожи лица при ее инволюционных изменениях в качестве антивозрастной терапии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании, проводимом в сентябре–ноябре 2017 г. на кафедре дерматовенерологии ФГБУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова, приняли участие 10 здоровых женщин-добровольцев в возрасте 50–55 лет, подписавших добровольное информированное согласие. Исследование одобрено Независимым этическим комитетом (протокол №2 от 08.02.2017 г.) и Ученым советом ГБУЗ Московский научно-практический центр дерматологии и косметологии Департамента здравоохранения г. Москвы (протокол №3 от 02.03.2017 г.). Критерии включения: добровольное согласие участвовать в исследовании, возраст 50–55 лет, женский пол, отсутствие воспалительных и инфекционных поражений кожи лица, нормальное содержание сахара в крови. Критерии исключения: наличие воспалительных и/или инфекционных поражений кожи лица; проведение любого вида антивозрастной терапии менее чем за 3 месяца до включения в настоящее исследование; наличие сахарного диабета, хронического заболевания почек или печени, васкулита или заболевания сердечно-сосудистой системы в стадии декомпенсации.

Всем участницам обследовали кожу лица: 1 зону — Т-зону (лоб, центр), 2 зону — область «гусиных лапок» справа, 3 зону — область «гусиных лапок» слева — на аппарате DUB SkinScanner (Digital Ultraschall Bildsystem, Германия), оснащенного двумя датчиками с частотами 22 и 75 МГц и разрешением 72 и 21 мкм соответственно с использованием датчика с центральной частотой 75 МГц. Исследование проводили до начала применения НТП и через сутки после проведения последней процедуры. В качестве проводника применяли

стандартный ультразвуковой гель. Интерпретацию и анализ полученных данных осуществляли на оригинальном программном обеспечении к сканеру DUB-SkinScanner в соответствии с инструкцией. Исследование проводили при комнатной температуре в положении лежа. Измеряли среднюю толщину эпидермиса, среднюю толщину дермы, ультразвуковую плотность эпидермиса, ультразвуковую плотность дермы, микрорельеф (длину по наружному контуру эпидермиса), рассчитывали показатель деформации эпидермиса и коэффициент распределения ультразвуковой плотности в дерме (РузПД), т. е. отношение ультразвуковой плотности нижних отделов к ультразвуковой плотности верхних отделов; нормальное значение должно составлять от 0,75 до 1,70 ед. [33, 34].

После процедуры очищения проводили обработку кожи лица низкотемпературной атмосферной плазмой, генерируемой отечественным прибором «ГЕЛИОС» («НПЦ Плазма», Россия) (рис. 1), в среде инертного газа гелия по типу плазменного факела, получаемого при выходе гелия из баллона со скоростью 1,5 л/мин по шкале ротаметра со средней интенсивностью струи. Время экспозиции НТП составило 10 мин на область «гусиных лапок» с каждой стороны и 5 мин на межбровную область (Т-зона, проекция мышцы «гордецов»). Всего каждая участница получила по 10 процедур, проводимых через день.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Состояние кожи лица всех пациенток до эксперимента расценивали как 3-й морфотип инволюционных изменений (пастозность лица, опущение уголков рта, выраженность морщин в уголках глаз («гусиные лапки»), морщины верхнего и нижнего века, кисетные морщины в области верхней губы; избыток кожи в области верхнего и нижнего века), у одной — глубокий залом в межбровной области. На рис. 2А и 3А представлены фото участниц исследования с типичными инволюционными изменениями кожи лица.

По результатам УЗИ (табл. 1) во всех зонах были отмечены значительная деформация микрорельефа, утолщение эпидермиса при сохранении четкой границы эпидермиса и дермы, некоторое снижение толщины дермы, ее достаточно однородная эхоструктура,



Рис. 1. Генератор низкотемпературной атмосферной плазмы «ГЕЛИОС», производства «НПЦ Плазма», Россия

смазанное отграничение дермы от гиподермы. В одном случае (участница 50-ти лет) в Т-зоне визуализировался выраженный залом шириной 2867 мкм и глубиной 250 мкм (рис. 2А).

После завершения курса воздействия НТП на кожу лица у всех участниц исследования отмечена положительная динамика (табл. 1, рис. 2Б и 3Б). Деформация эпидермиса уменьшилась в Т-зоне на 35% , в области «гусиных лапок» на 58% и 30%, справа и слева соответственно. При этом средняя толщина эпидермиса сократилась на 13,3%, 5,0% и 6,3% соответственно. Снижение ультразвуковой плотности эпидермиса составило в Т-зоне 20%, в области «гусиных лапок» справа 46,6% и слева 35,6%, что свидетельствует об улучшении трофики эпидермиса. Положительные изменения отмечены также в дерме. Средняя толщина дермы увеличилась в Т-зоне на 6%, в области «гусиных лапок» справа на 1,2% и слева на 2,7%. Ультразвуковая плотность дермы вместе с тем понизилась на 37,7%, 20,6% и 52,2% соответственно. Отмеченные изменения тоже свидетельствуют о нормализации трофики дермы, гидратации ткани. В целом структура кожи в исследованных зонах существенно улучшилась, что подтверждается повышением значения РУзГД на 27,1%, 11,9% и 30,3% соответственно. Залом в межбровной области участницы 50-ти лет уменьшился в ширине, правда его глубина осталась прежней (рис. 2Б).

Наибольшие изменения отмечались со стороны микрорельефа в области «гусиных лапок»: он стал более сглаженным, уменьшилась глубина морщин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что при воздействии НТП происходит генерация большого количества активных форм кислорода и азота, УФ-протонов, электронов и различных ионов [32]. Экспериментально было показано увеличение микроциркуляции в коже под воздействием НТП низкой интенсивности, что сопровождается гидратацией и активизацией синтеза коллагена [33–35]. В коже здоровых добровольцев (мужчин и женщин старше 18 лет) под действием НТП улучшение микроциркуляции и снижение рН зависело от продолжительности воздействия [36]. Показано также, что под действием оксида азота, генерируемого НТП низкой интенсивности происходит активация β -катенина клетками эпидермиса, приводящая к регенерации клеток эпидермиса [37].

Для нормального функционирования эпидермиса необходим баланс между пролиферацией кератиноцитов и их апоптозом (естественной гибелью клеток), повторяющееся воздействие НТП на поврежденную кожу приводит к нормализации толщины эпидермиса и быстрой регенерации [37]. В настоящее время НТП используется для микробной деконтаминации и ускорения заживления ран и трофических язв, возможность применения НТП в регенеративной медицине тоже является предметом изучения. Наше исследование подтверждает безопасность применения НТП на коже пациентов. Мы показали, что после 10 процедур обработки кожи лица отмечается статистически значимое уменьшение ультразвуковой

Таблица 1. Результаты УЗИ кожи лица по зонам до и после курса воздействия НТП (М \pm σ)

Показатель	До обработки кожи НТП			После обработки кожи НТП		
	1 зона	2 зона	3 зона	1 зона	2 зона	3 зона
Микрорельеф, мм	13,2 \pm 0,1	13,2 \pm 0,3	13,1 \pm 0,2	13,1 \pm 0,1	12,9 \pm 0,08	13,02 \pm 0,13
Деформация эпидермиса, ед.	0,416 \pm 0,07	0,43 \pm 0,26	0,33 \pm 0,18	0,27 \pm 0,09*	0,18 \pm 0,08*	0,23 \pm 0,13*
Толщина эпидермиса, мкм	72,9 \pm 12,3	64,3 \pm 10,0	65,1 \pm 7,8	63,3 \pm 8,2*	61,1 \pm 8,7*	61,0 \pm 9,8*
УЗ-плотность эпидермиса, ед.	142,1 \pm 12,8	106,6 \pm 7,2	125,6 \pm 28,7	113,7 \pm 24,0*	56,9 \pm 21,0*	82,1 \pm 33,7*
Толщина дермы, мкм	1521,6 \pm 249,8	1313,4 \pm 121,1	1292,4 \pm 106,1	1612,4 \pm 168,0*	1329,1 \pm 136,4*	1326,4 \pm 92,4*
УЗ-плотность дермы, ед.	11,4 \pm 6,7	19,9 \pm 14,6	20,7 \pm 10,8	7,1 \pm 4,7	15,8 \pm 14,8	9,9 \pm 5,1
РУзГД	0,70 \pm 0,11	1,09 \pm 0,16	0,944 \pm 0,191	0,89 \pm 0,14*	1,22 \pm 0,18*	1,23 \pm 0,28*

Примечание: РУзГД — распределение ультразвуковой плотности в дерме; * — статистически значимые различия между соответствующими показателями до и после воздействия НТП ($p < 0,05$).



Рис. 2. Изменение межбровной области на фоне воздействия НТП. А. До воздействия. Б. После 10 процедур воздействия НТП



Рис. 3. Изменение кожи в области «гусиных лапок» лица справа. А. До воздействия. Б. После 10 процедур воздействия НТП

плотности эпидермиса, что свидетельствует об уменьшении избыточной толщины рогового слоя эпидермиса, улучшении микроциркуляции и улучшении качества гидролипидной мантии кожи, что согласуется с опубликованными экспериментальными данными [7, 12, 17, 33, 34]. Снижение ультразвуковой плотности дермы объясняется гидратацией глубоких структур кожи. Достигнутые изменения структуры кожи говорят об антивозрастном эффекте проводимых процедур. Все участницы исследования отметили визуальные улучшения кожи лица в виде уменьшения числа и глубины морщин в зонах исследования. До конца не ясным остается вопрос, какое количество процедур необходимо проводить и с какой кратностью для достижения максимального эффекта. Возможно, что выявленные нами положительные изменения структуры кожи лица оказались бы более

значимыми при большем количестве процедур, что требует дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

Физическое воздействие НТП малой интенсивности может существенно улучшить состояние эпидермального слоя кожи, сгладить морщины, появление которых ухудшает эмоциональное состояние женщин. Вместе с тем, каких-либо нежелательных явлений со стороны кожного покрова и придатков кожи в результате исследования мы не обнаружили. Необходимо продолжить клиническое исследование применения НТП в косметологии с целью отработки технологии проведения процедур и продолжительности курса для достижения максимального антивозрастного эффекта.

Литература

- Zouboulis C, Makrantonaki E. Clinical aspect and molecular diagnostics of skin aging. *Clinics in dermatology*, 2011; 29: 3–14.
- Борхунова Е. Н., Таганов А. В. Новая косметология. Микроскопические изменения кожи при старении. М.: ИД «Косметика и медицина», 2017. с. 74–102.
- Ашер Б. Косметологические процедуры в области лица. Инъекционные методы в косметологии. М.: Изд. «МЕДпресс-Информ», 2014; с. 179–215.
- Труфанов В. Д., Коган Е. А., Юцковская Я. А., Файзулина Н. М., Иванов С. Ю. Радиоволны высокой частоты — инновационный подход к коррекции возрастных изменений кожи; клиническое, иммуногистохимическое исследование. *СТМ*. 2016; 8 (1): 106–16.
- Марголина А., Эрнандес Е. Новая косметология. М.: ИД «Косметика и медицина», 2015.
- Саромыцкая А. Н. Сочетанное применение фракционного фототермолиза и ботулинотерапии в коррекции гипертрофических и келоидных рубцовых деформаций кожи. М.: ИД «Косметика и медицина», 2016; с. 278–86.
- Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, Stolz W, Isbary G, Zimmermann J, Shimizu T, Karrer S. Plasma medicine: possible applications in dermatology. *JDDG*. 2010; 12: 968–76.
- Okazaki Y, Wang Y, Tanaka H, et al. Direct exposure of non-equilibrium atmospheric pressure plasma confers simultaneous oxidative and ultraviolet modifications in biomolecules. *J Clin Biochem Nutr*. 2014; 55: 207–15.
- Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G, Ahmed R, Pfeiffer S, Gorlitz A, et al. Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm®) VU-2010): results of monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015; 29(1): 148–55.
- Haertel B, von Woedtke Th, Weltmann K-D, Lindequist U. Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma Possible Application in Wound Healing. *Biol Therapeutics*. 2014; 22: 477–90.
- Akishev Y. Atmospheric pressure non-thermal plasma sterilization of microorganisms in liquids and on the surfaces. *Pure and Applied Chemistry*. 2008; 80 (9): 1953–69.
- Laroussi M, Kong M, Morfill G, Stolz W (eds). *Plasma medicine: application of low-temperature gas plasmas in medicine and biology*. Cambridge University Press, 2012.
- Короткий В. Н. Низкотемпературная атмосферная плазма в дерматологии. *Клиническая дерматология и венерология*. 2017; 16 (5): 4–11.
- Toyokuni S. The origin and future of oxidative stress pathology: from the recognition of carcinogenesis as an iron addiction with ferroptosis-resistance to non-thermal plasma therapy. *Pathol Int*. 2016; 66: 245–59.

15. Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med* 2011; 32: 234–46.
16. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*. 2009; 7: 65–74.
17. Yousfi M, Merbahi N, Pathak A, Eichwald O. Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2014; 28: 123–35.
18. Kalghatgi S, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann Biomed Eng*. 2010; 38: 748–57.
19. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PLoS ONE*. 2011; 6: e16270.
20. Moureau M, Orange N, Feuilloley MGL. Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotechnol Adv*. 2008; 26: 610–17.
21. Shimizu T, Zimmermann JL, Morfill GE. The bactericidal effect of surface micro-discharge plasma under different ambient conditions. *New Journal of Physics* 2011; 13: 1–7.
22. Ermolaeva SA, Varfolomeev AF, Chernukha MY, Yurov DS, Vasiliev MM, Kaminskaya AA, et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J Med Microbiol*. 2011; 60: 75–83.
23. Ehlbeck J, Schnabel U, Polak M, Winter J, von Woedtke Th, Brandenburg R, et al. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *J Phys D: Appl Phys*. 2011; 44: 013002.
24. Lademann O, Kramer A, Richter H, Patzelt A, Meinke MC, et al. Skin disinfection by plasma-tissue interaction: comparison of the effectivity of tissue-tolerable plasma and a standard antiseptic. *Skin Pharmacol Physiol*. 2011; 24: 284–88.
25. Maisch T, Shimizu T, Li Y-F, Heinlin J, Karrer S, Morfill G, et al. Decolonisation of MRSA, *S. aureus* and *E. Coli* by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro. *PLoS ONE*. 2012; 7: e34610.
26. Daeschlein G, Scholz S, Emmert S, von Podewils S, Haase H, von Woedtke Th. Plasma medicine in dermatology: basic antimicrobial efficacy testing as prerequisite to clinical plasma therapy. *Plasma Med*. 2012; 2 (1–3): 33–69.
27. Daeschlein G, Napp M, von Podewils S, Lutze S, Emmert S., Lange A, et al. In vitro susceptibility of multidrug resistant skin and wound pathogens against low temperature atmospheric pressure plasma jet (APPJ) and dielectric barrier discharge plasma (DBD). *Plasma Process Polymers*. 2014; 11: 175–83.
28. Bekeschus S, Masur K, Kolata J, Wende K, Schmidt A, Bundscherer L, et al. Human mononuclear cell survival and proliferation is modulated by cold atmospheric plasma jet. *Plasma Process Polym*. 2013; 10: 706–13.
29. Короткий В. Н. Возможности применения холодной атмосферной плазмы в онкологии (обзор литературы). *Сибирский онкологический журнал*. 2018; 17 (1): 72–81.
30. Безуглый А. П., Бикбулатова Н. Н., Шугина Е. А., Белков П. А., Хабутдинова Н. Р. Ультразвуковое исследование кожи в практике врача-косметолога. *Вестник Дерматологии Венерол*. 2011; 3: 142–152.
31. Безуглый А. П., Потекаев Н. Н., Сапожникова Ю. А. Ультразвуковое сканирование высокого разрешения в дерматологии и медицинской косметологии. *Экспериментальная и клиническая дерматокосметология*. 2014; 2: 20–25.
32. Bibinov N, Knake N, Bahre H, Awakowicz P, von der Gathen VS. Spectroscopic characterization of an atmospheric pressure μ -jet plasma source. *J Phys D: Appl Phys*. 2011; 44 (34): 345204.
33. Heuer K, Hoffmanns MA, Demir E, Baldus S, Volkmar CM, Röhle M, et al. The topical use of non-thermal dielectric barrier discharge (DBD): nitric oxide related effects on human skin. *Nitric Oxide*. 2015; 44: 52–60.
34. Kisch T, Helmke A, Schleusser S, Song J, Liodaki E, Stang FH, Mailaender P, Kraemer R. Improvement of cutaneous microcirculation by cold atmospheric plasma (CAP): results of a controlled, prospective cohort study. *Microvasc Res*. 2016; 104: 55–62.
35. Kisch T, Schleusser S, Helmke A, Mauss KL, Wenzel ET, Hasemann B, et al. The repetitive use of non-thermal dielectric barrier discharge plasma boosts cutaneous micro-circulatory effects. *Microvasc Res*. 2016; 106: 8–13.
36. Borchardt T, Ernst J, Helmke A, Tanyeli M, Schilling AF, Felmerer G, et al. Effect of direct cold atmospheric plasma (diCAP) on microcirculation of intact skin in a controlled mechanical environment. *Microcirculation*. 2017; 24: e12399.
37. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10: 207–17.

References

1. Zouboulis C, Makrantonaki E. Clinical aspect and molecular diagnostics of skin aging. *Clinics in dermatology*, 2011; 29: 3–14.
2. Борхуннова ЕН, Таганов ФВ. *Новая косметология. Микроскопическое изменение кожи при старении. М.: ID «Kosmetika i meditsina», 2017; s. 74–102.*
3. Asher B. *Kosmetologicheskie protseduri v oblasti litsa. In'ektsionnie metody v kosmetologii. Izd. «MEDpress-Infom», 2014; s. 179–215.*
4. Trufanov VD, Kogan EA, Yutskovskaya JaA, Faizulina NM, Ivanov SYu. *Radiovolni visokoy chastoti – innovatsionni podhod k korrektsii vozrastnih izmenenii koghi; klinicheskoe, immunogistohimicheskoe issledovanie. STM. 2016; 8 (1); 106–16.*
5. Margolina A, Aernandes E. *Novaya kosmetologiya. M.: ID «Kosmetika i meditsina», 2015.*
6. Saromitskaya AN. *Sochetannoe primenenie fraktsionirovannogo fototermoliza i botulinoterapii v korrektsii gipertroficheskikh i keloidnih rubtsovnyh deformatsij koghi. M.: ID «Kosmetika i meditsina», 2016; s. 278–86.*
7. Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, Stolz W, Isbary G, Zimmermann J, Shimizu T, Karrer S. *Plasma medicine: possible applications in dermatology. JDDG. 2010; 12: 968–976.*
8. Okazaki Y, Wang Y, Tanaka H, et al. Direct exposure of non-equilibrium atmospheric pressure plasma confers simultaneous oxidative and ultraviolet modifications in biomolecules. *J Clin Biochem Nutr*. 2014; 55: 207–15.
9. Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G, Ahmed R, Pfeiffer S, Gorlitz A, et al. Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm®) VU-2010): results of monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015; 29(1): 148–55.
10. Haertel B, von Woedtke Th, Weltmann K-D, Lindequist U. *Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma Possible Application in Wound Healing. Biol Therapeutics. 2014; 22: 477–90.*
11. Akishev Y. *Atmospheric pressure non-thermal plasma sterilization of microorganisms in liquids and on the surfaces. Pure and Applied Chemistry. 2008; 80 (9): 1953–69.*
12. Laroussi M, Kong M, Morfill G, Stolz W (eds). *Plasma medicine: application of low-temperature gas plasmas in medicine and biology. Cambridge University Press, 2012.*
13. Korotky VN. *Nizkotemperaturnaya atmosferynaya plasma v dermatologii. Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya. 2017; 16 (5): 4–11.*
14. Toyokuni S. *The origin and future of oxidative stress pathology: from the recognition of carcinogenesis as an iron addiction with ferroptosis-resistance to non-thermal plasma therapy. Pathol Int. 2016; 66: 245–59.*

15. Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med* 2011; 32: 234–46.
16. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*. 2009; 7: 65–74.
17. Yousfi M, Merbahi N, Pathak A, Eichwald O. Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2014; 28: 123–35.
18. Kalghatgi S, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann Biomed Eng*. 2010; 38: 748–57.
19. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PLoS ONE*. 2011; 6: e16270.
20. Moureau M, Orange N, Feuilletoy MGL. Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotechnol Adv*. 2008; 26: 610–17.
21. Shimizu T, Zimmermann JL, Morfill GE. The bactericidal effect of surface micro-discharge plasma under different ambient conditions. *New Journal of Physics* 2011; 13: 1–7.
22. Ermolaeva SA, Varfolomeev AF, Chernukha MY, Yurov DS, Vasiliev MM, Kaminskaya AA, et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J Med Microbiol*. 2011; 60: 75–83.
23. Ehlbeck J, Schnabel U, Polak M, Winter J, von Woedtke Th, Brandenburg R, et al. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *J Phys D: Appl Phys*. 2011; 44: 013002.
24. Lademann O, Kramer A, Richter H, Patzelt A, Meinke MC, et al. Skin disinfection by plasma-tissue interaction: comparison of the effectivity of tissue-tolerable plasma and a standard antiseptic. *Skin Pharmacol Physiol*. 2011; 24: 284–88.
25. Maisch T, Shimizu T, Li Y-F, Heinlin J, Karrer S, Morfill G, et al. Decolonisation of MRSA, *S. aureus* and *E. Coli* by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro. *PLoS ONE*. 2012; 7: e34610.
26. Daeschlein G, Scholz S, Emmert S, von Podewils S, Haase H, von Woedtke Th. Plasma medicine in dermatology: basic antimicrobial efficacy testing as prerequisite to clinical plasma therapy. *Plasma Med*. 2012; 2 (1–3): 33–69.
27. Daeschlein G, Napp M, von Podewils S, Lutze S, Emmert S., Lange A, et al. In vitro susceptibility of multidrug resistant skin and wound pathogens against low temperature atmospheric pressure plasma jet (APPJ) and dielectric barrier discharge plasma (DBD). *Plasma Process Polymers*. 2014; 11: 175–183.
28. Bekeschus S, Masur K, Kolata J, Wende K, Schmidt A, Bundscherer L, et al. Human mononuclear cell survival and proliferation is modulated by cold atmospheric plasma jet. *Plasma Process Polym*. 2013; 10: 706–13.
29. Korotky VN. Vozmognosti primeneniya kholodnoy amosernoy plazmy v onkologii (obzor literatury). *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal*. 2018; 17 (1): 72–81.
30. Bezuglii AP, Bikbulatova NN, Shuginina EA, Belkov PA, Habutdinova NR. Ul'trazvukovoe issledovanie koghi v praktike vracha-kosmetologa. *Vestnik Dermatologii i venerologii*. 2011; 3: 142–152.
31. Bezuglii AP, Potekaev NN, Sapoghnikova YuA. Ul'trazvukovoe skanirovanie visokogo razresheniya v dermatologii i meditsinskoj kosmetologii. *Eksperimental'naya i klinicheskaya dermatovenerologiya*. 2014; 2: 20–25.
32. Bibinov N, Knake N, Bahre H, Awakowicz P, von der Gathen VS. Spectroscopic characterization of an atmospheric pressure μ -jet plasma source. *J Phys D: Appl Phys*. 2011; 44 (34): 345204.
33. Heuer K, Hoffmanns MA, Demir E, Baldus S, Volkmar CM, Röhle M, et al. The topical use of non-thermal dielectric barrier discharge (DBD): nitric oxide related effects on human skin. *Nitric Oxide*. 2015; 44: 52–60.
34. Kisch T, Helmke A, Schleusser S, Song J, Liadaki E, Stang FH, Mailaender P, Kraemer R. Improvement of cutaneous microcirculation by cold atmospheric plasma (CAP): results of a controlled, prospective cohort study. *Microvasc Res*. 2016; 104: 55–62.
35. Kisch T, Schleusser S, Helmke A, Mauss KL, Wenzel ET, Hasemann B, et al. The repetitive use of non-thermal dielectric barrier discharge plasma boosts cutaneous micro- circulatory effects. *Microvasc Res*. 2016; 106: 8–13.
36. Borchardt T, Ernst J, Helmke A, Tanyeli M, Schilling AF, Felmerer G, et al. Effect of direct cold atmospheric plasma (diCAP) on microcirculation of intact skin in a controlled mechanical environment. *Microcirculation*. 2017; 24: e12399.
37. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10: 207–17.

КОМПЕТЕНТНОСТЬ ПЛАСТИЧЕСКИХ ХИРУРГОВ

Н. Е. Мантурова¹, В. В. Кочубей²✉, А. В. Кочубей³¹ Кафедра пластической, реконструктивной хирургии, косметологии и клеточных технологий, факультет дополнительного профессионального образования, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва² Кафедра факультетской хирургии № 1, лечебный факультет, Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова, Москва³ Кафедра общественного здоровья и здравоохранения, Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства, Москва

Отечественная система непрерывного медицинского образования (НМО) не гарантирует ежегодного прогресса профессиональной компетентности у всех ее участников: врачами не предоставляются отчеты о количестве и спектре проделанных операций, оценка компетентности и создание планов индивидуального обучения проводятся ими самостоятельно без участия профессионального сообщества. В этой связи актуальным является изучение компетентности пластических хирургов и объективности ее самооценки. Изучение проводили с помощью очного одноэтапного анкетирования. Анкета содержала два раздела. Первый раздел включал тесты для самооценки компетентности по 9 трудовым функциям пластического хирурга, где 1 означало, что нет опыта, 2 — новичок, 3 — специалист, 4 — знаток, 5 — эксперт. Во второй раздел входили тестовые задания закрытого типа простого одновариантного выбора для объективной оценки знаний респондентов. Правильный ответ оценивали в 1 балл, неверный — 0. В анкетировании приняли участие 162 человека. Средний возраст респондентов был $31,5 \pm 6,9$ года, средний стаж работы $4,0 \pm 4,8$ года. Для статистического анализа рассчитывали критерии Колмогорова–Смирнова, Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, коэффициент Спирмена, использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), тест Левена, тест Дункана. Статистически значимыми считали значения при $p < 0,05$. По результатам исследования общий уровень самооценки всех респондентов составил $2,1 \pm 0,92$ балла. Обнаружена статистически значимая ($p < 0,001$) корреляция стажа с уровнем самооценки ($r_s = 0,72$). Средняя оценка по тестам составила $2,6 \pm 1,76$ баллов из 9 максимально возможных. Незначимой оказалась корреляция тестовой оценки со стажем работы ($r_s = -0,08$, $p = 0,3$) и с самооценкой ($r_s = -0,006$, $p = 0,9$).

Ключевые слова: компетентность пластических хирургов, самооценка компетентности пластическими хирургами, объективность самооценки компетентности

✉ **Для корреспонденции:** Кочубей Валентин Владимирович
ул. Делегатская, д. 20/1, г. Москва, 127473; kochoubey@gmail.com**Статья получена:** 24.04.2018 **Статья принята к печати:** 23.05.2018**DOI:** 10.24075/vrgmu.2018.023

THE COMPETENCE OF PLASTIC SURGEONS

Manturova NE¹, Kochubey VV²✉, Kochubey AV³¹ Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Cosmetology and Cell Technologies, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow² Department of faculty surgery №1, Faculty of Medicine, Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow³ Department of Public health and Healthcare Management, Institution of Advanced Training FMBA, Moscow

Russian system of continuous medical education does not guarantee professional development of its participants: doctors do not report the number and specifics of the operations performed, self-assess their competence and compile individual professional development plans, and the professional community does not take part in these processes. Therefore, there is a need for accurate assessment of competence of plastic surgeons and objectivity of their self-assessment. We have conducted a study in the form of a single-stage questionnaire filled by the surgeons in person. The questionnaire contained two sections. The first section offered a competence self-assessment table listing 9 plastic surgery specialties; the participants used a 5-point scoring system to state their level, where 1 meant "no experience", 2 — "beginner", 3 — "specialist", 4 — "knowledgeable", 5 — "expert". The second section contained 9 test tasks (closed, univariate) used to objectively assess the level of competence of the participants. Each correct answer added 1 point to the participant's score, wrong answers added nothing. 162 people took part in the survey. The average age of the participants was 31.5 ± 6.9 years; average length of service — 4.0 ± 4.8 years. Analyzing the data, we applied the Kolmogorov-Smirnov test, Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test, Spearman's coefficient, used ANOVA, Levene's test, Duncan test. The values were considered statistically significant at $p < 0.05$. The overall self-assessment score was 2.1 ± 0.92 points. We have discovered a statistically significant ($p < 0.001$) correlation of the length of service with the level of self-assessment ($r_s = 0.72$). The average score for the second section, the tests, was 2.6 ± 1.76 points (out of 9). The correlation between the test score and the length of service was insignificant ($r_s = -0.08$, $p = 0.3$); same is true for the self-assessment ($r_s = -0.006$, $p = 0.9$).

Keywords: competence of plastic surgeons, self-assessment of competence by plastic surgeons, objectivity of self-assessment of competence

✉ **Correspondence should be addressed:** Valentin Vladimirovich Kochubey
Delegatskaya, 20/1, Moscow, 127473; kochoubey@gmail.com**Received:** 24.04.2018 **Accepted:** 23.05.2018**DOI:** 10.24075/brsmu.2018.023

Согласно законодательству, врач обязан совершенствовать профессиональные знания и навыки путем обучения по дополнительным профессиональным программам [1]. Модернизация отечественной системы медицинского образования нацелена на претворение в жизнь принципа непрерывности повышения квалификации [2]. Для реализации данного принципа создан портал непрерывного медицинского и фармацевтического образования, работа которого поддерживается Центром научно-методического обеспечения перехода на систему непрерывного медицинского и фармацевтического образования Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова [3, 4]. Портал содержит программы непрерывного образования и образовательные мероприятия, одобренные Комиссией по развитию непрерывного медицинского и фармацевтического образования Министерства здравоохранения Российской Федерации [5]. Таким образом, качество образовательного контента в системе НМО гарантировано. Одновременно портал предоставляет возможность врачу самостоятельно формировать индивидуальный план обучения [3], т. е. повышение квалификации врача зависит от индивидуальных установок врача, его личного стремления к освоению большего спектра профессиональных навыков, а главное, объективности самооценки.

На сегодняшний день тестирование при периодической аккредитации является единственным инструментом «отсева» неквалифицированных специалистов и, безусловно, служит стимулом для повышения квалификации [6]. Но периодическая аккредитация проходит один раз в пять лет и является контрольной точкой допуска врача к специальности. Система НМО в этот пятилетний период не обязует врача к ежегодному повышению компетентности в области профессиональной деятельности, в отличие от зарубежных систем НМО [7–10]. Последние демонстрируют успешность механизмов, используемых для подтверждения ежегодного прогресса профессиональной компетентности, таких как представление в портфолио отчетов о количестве и спектре операций, оценка компетентности профессиональным сообществом и совместное с организацией создание индивидуального плана обучения с выбором тем, обязательных к освоению [11–14].

Целью исследования было изучение компетентности пластических хирургов и объективности ее самооценки по трудовым функциям (ТФ) врача-специалиста в области пластической хирургии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования проводили однократное очное анкетирование врачей, имеющих сертификат по специальности «пластическая хирургия», что являлось критерием включения. Анкета содержала два раздела. Первый включал таблицу для самооценки компетентности по 9 ТФ пластического хирурга от 1 балла («нет опыта») до 5 баллов («эксперт»). Всего по каждой ТФ было выделено 5 групп: 1 — без опыта, 2 — новички, 3 — «знатоки», 3 — «специалисты», 4 — «эксперты».

Среднее значение баллов, выставленное респондентом по всем трудовым функциям, обозначало в настоящем исследовании «общий уровень самооценки». По общему уровню самооценки было выделено 3 группы: низкая самооценка — средний балл от 0 до 2, средняя самооценка — средний балл от 2 до 4, высокая самооценка — средний балл самооценки от 4 до 5 баллов.

Второй раздел содержал 9 тестовых заданий закрытого типа простого, одновариантного выбора для объективной оценки знаний анкетированных. Тестовые задания были взяты из сборника тестов, используемых при итоговой аттестации резидентов [15]. Правильному ответу присваивали 1 балл, неверный ответ — 0 баллов. Общее количество баллов для отдельного респондента было определено как «общий уровень оценки» с минимальным значением 0 и максимальным значением 9.

В анкетировании приняли участие 162 человека. Анкетирование проводили анонимно. Респонденты указывали возраст, пол и стаж работы в области пластической хирургии.

Средний возраст респондентов составил $31,5 \pm 6,9$ лет, средний стаж работы $4,0 \pm 4,8$ лет. Среди респондентов было 63 женщины (средний возраст $32,1 \pm 8,6$ лет, средний стаж $4,5 \pm 0,8$ лет) и 99 мужчин (средний возраст $31,2 \pm 5,5$ года, средний стаж $3,7 \pm 0,4$ года). По стажу в рамках исследования было выделено 4 группы: стаж 0 лет — 14,2% респондентов, стаж 1–5 лет — 58,0%, стаж 6–10 лет — 20,4%, стаж более 10 лет — 7,4%. Распределение по возрасту, стажу и вариантам самооценки респондентов является неравномерным ($p < 0,001$).

Для оценки равномерности распределения использовали тест Колмогорова–Смирнова, отклонение от нормального распределения считал значимым при $p < 0,05$. Для оценки различия между двумя группами использовали критерий Манна–Уитни (U), между множеством групп — однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с одновременным определением гомогенности дисперсий (тест Левена), а также критерий Краскела–Уоллиса (Хи-квадрат). Выделение гомогенных групп проводили с помощью теста Дункана. Корреляцию между признаками подтверждали расчетом коэффициента Спирмена (r_s). Статистически значимыми критерии и коэффициенты считали при $p < 0,05$. Осуществляли расчет средних, стандартных отклонений, процентных долей.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics (версия 23).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По всем ТФ при самооценке большинство пластических хирургов выбрало категорию «нет опыта» (табл. 1).

По всем ТФ доля респондентов уменьшалась по мере повышения их самооценки, за исключением ТФ «хирургия руки и кисти». По этой специальности доля респондентов, выбравших категорию «специалист», превышала долю респондентов, выбравших категорию «знатоки». Свою компетентность в данной ТФ, а также по ТФ «урогенитальная пластика» и «краниофациальная пластика» респонденты оценили наиболее низко.

Общий уровень самооценки всех респондентов составил $2,1 \pm 0,92$ балла. По ТФ «пластика уха» этот показатель достиг $2,2 \pm 1,12$ балла, по ТФ «пластика носа» — $2,1 \pm 1,08$, по ТФ «пластика век» — $2,3 \pm 1,36$, по ТФ «пластика губ» — $2,0 \pm 1,16$, по ТФ «пластика груди» — $2,4 \pm 1,32$, по ТФ «урогенитальная пластика» — $1,5 \pm 0,96$, по ТФ «пластика покровных тканей» — $2,4 \pm 1,24$, по ТФ «краниофациальная пластика» — $1,9 \pm 1,14$, по ТФ «хирургия руки и кисти» — $1,8 \pm 1,09$.

Сравнение самооценки компетентности по выделенным группам с различным стажем работы (0 лет, 1–5 лет, 6–10 лет, более 10 лет) показало, что уровень самооценки компетентности по всем ТФ различается (Хи-квадрат 66,9;

$p < 0,001$). По мере роста стажа работы увеличивается средний ранг самооценки (табл. 2).

С учетом полученных результатов и факта, что в группах с большим стажем работы уменьшается доля респондентов, оценивающих себя по категории «нет опыта», и увеличивается число лиц, считающих себя «специалистами» и «экспертами», исследовали наличие связи между стажем и уровнем самооценки. Обнаружена статистически значимая ($p < 0,001$) корреляция стажа с общим уровнем самооценки ($r_s = 0,72$) и уровнем самооценки по отдельным ТФ: «пластика уха» $r_s = 0,64$, «пластика носа» $r_s = 0,52$, «пластика век» $r_s = 0,57$, «пластика губ» $r_s = 0,66$, «пластика груди» $r_s = 0,72$, «урогенитальная пластика» $r_s = 0,35$, «пластика покровных тканей» $r_s = 0,62$, «краниофациальная пластика» $r_s = 0,46$, «хирургия руки и кисти» $r_s = 0,42$.

Из общего числа респондентов ни одного правильного ответа на вопросы тестов не дали 7,4% человек, один верный ответ дали 22,8%, два правильных ответа — 20,4%, три — 17,9%, четыре — 20,4%, пять — 5,6%, шесть — 3,7%, девять — 1,9% респондентов. Доля респондентов, ответивших верно на вопросы тестовых заданий, по ТФ «пластика уха» составила 53,1%, «пластика носа» — 46,9%, «пластика век» — 21%, «пластика губ» — 20,4%, «пластика

груди» — 20,4%, «урогенитальная пластика» — 24,1%, «пластика покровных тканей» — 34%, «краниофациальная пластика» — 32,1%, «хирургия руки и кисти» — 13%.

Средний общий уровень оценки респондентов составил $2,6 \pm 1,76$ балла. Корреляция «общего уровня оценки» по всем вопросам тестовых заданий со стажем работы отсутствовала ($r_s = -0,08$; $p = 0,3$). Не обнаружена корреляция стажа и частоты правильных ответов по ТФ: «пластика уха» ($r_s = -0,03$; $p = 0,7$), «пластика век» ($r_s = -0,05$; $p = 0,5$), «урогенитальная пластика» ($r_s = -0,09$; $p = 0,2$), «пластика покровных тканей» ($r_s = -0,05$; $p = 0,5$). Обнаружена статистически значимая, но обратная корреляция стажа и частоты правильных ответов по ТФ «пластика груди» ($r_s = -0,2$; $p = 0,01$), «краниофациальная пластика» ($r_s = -0,05$; $p = 0,01$). Только по ТФ «пластика носа» и «пластика губ» имеется значимая слабая прямая корреляция стажа и частоты верных ответов ($r_s = 0,27$; $p = 0,001$ и $r_s = 0,19$; $p = 0,02$ соответственно).

Распределение верных ответов в 4 группах, отличающихся по стажу работы, не равномерное (Хи-квадрат 12,1; $p = 0,007$).

«Общий уровень оценки» у респондентов, включенных в три сформированные в процессе исследования группы самооценки (низкий, средний, высокий), также значимо не

Таблица 1. Самооценка компетентности пластических хирургов

Трудовая функция	Доля респондентов, выбравших категорию				
	нет опыта	новичок	знаток	специалист	эксперт
Пластика уха	37%	27,8%	16,7%	18,5%	-
Пластика носа	38,9%	27,8%	18,5%	14,8%	-
Пластика век	40,7%	22,2%	14,8%	13,0%	9,3%
Пластика губ	40,7%	33,3%	13,0%	7,4%	5,6%
Пластика груди	33,3%	29,6%	13,0%	14,8%	9,3%
Урогенитальная пластика	68,5%	20,4%	5,6%	1,9%	3,7%
Пластика покровных тканей	31,5%	25,9%	20,4%	16,7%	5,6%
Краниофациальная пластика	50,0%	29,6%	9,3%	5,6%	5,6%
Хирургия руки и кисти	57,4%	24,1%	5,6%	11,1%	1,9%

Таблица 2. Общий уровень оценки по стажу и группам самооценки

Стаж	Уровень самооценки	Средний общий уровень оценки
0 лет	низкий	$2,6 \pm 1,64$
	все	$2,6 \pm 1,64$
1–5 лет	низкий	$2,8 \pm 1,61$
	средний	$2,1 \pm 1,48$
	высокий	$1,0 \pm 0,00$
	все	$2,6 \pm 1,59$
6–10 лет	низкий	$2,0 \pm 1,09$
	средний	$3,8 \pm 2,24$
	все	$3,5 \pm 2,18$
Более 10 лет	низкий	$0,0 \pm 0,00$
	средний	$1,7 \pm 0,51$
	высокий	$2,0 \pm 0,00$
	все	$1,3 \pm 0,88$
Всего	низкий	$2,6 \pm 1,63$
	средний	$2,9 \pm 2,01$
	высокий	$1,5 \pm 0,55$
	все	$2,7 \pm 1,76$

отличается ($2,6 \pm 1,63$, $2,8 \pm 2,0$, $1,5 \pm 0,55$ соответственно, Хи-квадрат 3,3; $p = 0,20$). В табл. 2 представлен средний балл общего уровня оценки по 4 группам стажа и 3 уровням самооценки.

Незначима корреляция «общего уровня самооценки» с «общим уровнем оценки» ($r_s = -0,006$; $p = 0,9$). По отдельным ТФ распределение верных ответов в 5 группах (без опыта, новички, знатоки, специалисты, эксперты) также было одинаковым: «пластика уха» ($p = 0,36$), «пластика век» ($p = 0,31$), «пластика груди» ($p = 0,11$), «урогенитальная пластика» ($p = 0,45$). По ТФ «пластика носа» ($p = 0,0001$), «пластика губ» ($p = 0,015$), «пластика покровных тканей» ($p = 0,018$), «краниофациальная пластика» ($p = 0,002$), «хирургия руки и кисти» ($p = 0,005$) распределение верных ответов в 5 обозначенных группах было неравномерным.

Тест Дункана позволил выделить гомогенные группы по распределению верных ответов. По ТФ «пластика носа» одинаковое распределение верных ответов было в группах самооценки «без опыта» ($M = 0,25$) и «специалисты» ($M = 0,29$) ($p = 0,74$), а также в группах «знатоки» ($M = 0,60$) и «новички» ($M = 0,76$) ($p = 0,15$). По ТФ «пластика губ» не обнаружилось значимого различия между группами самооценки по распределению верных ответов: «без опыта» ($M = 0,09$) и «знатоки» ($M = 0,14$) ($p = 0,1$), отдельно «специалисты» ($M = 0,25$), «новички» ($M = 0,33$), «эксперты» ($M = 0,33$) ($p = 0,26$). По ТФ «пластика покровных тканей» гомогенными по распределению верных ответов были группы «эксперты» ($M = 0,00$) и «новички» ($M = 0,21$) ($p = 0,12$), и группы «без опыта» ($M = 0,35$), «специалисты» ($M = 0,44$), «знатоки» ($M = 0,48$) ($p = 0,07$). По ТФ «краниофациальная пластика» также образовались две гомогенные группы по распределению верных ответов, в одну вошли «знатоки» ($M = 0,00$), «эксперты» ($M = 0,00$), «без опыта» ($M = 0,33$) ($p = 0,05$), в другую — «новички» ($M = 0,40$) и «специалисты» ($M = 0,67$) ($p = 0,05$). По ТФ «хирургия руки и кисти» гомогенными по распределению верных ответов стали группы «новички», «знатоки», «эксперты» ($M = 0,00$ для всех) ($p = 0,34$), и группы «без опыта» ($M = 0,20$) и «специалисты» ($M = 0,33$) ($p = 0,26$).

Как видно из представленных данных о гомогенности групп по распределению верного ответа уровень самооценки не соответствует уровню компетентности, определенному с помощью тестирования. Более того, по большинству ТФ в группе «без опыта» частота верных ответов была выше, чем в группе «экспертов» (табл. 3).

По ТФ «пластика век», где среднее число верных ответов было выше в группе «эксперты», разница статистически незначима ($U = 486$, $p = 0,88$). Только по одной ТФ «пластика губ» средний балл правильных ответов в группе экспертов

был значимо выше, чем в группе «без опыта» ($U = 225$, $p = 0,04$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенного анкетирования установлено, что пластических хирургов отличает низкая самооценка уровня компетентности $2,1 \pm 0,92$ балл, особенно по ТФ «урогенитальная пластика» ($1,5 \pm 0,96$), «хирургия руки и кисти» ($1,8 \pm 1,09$), «краниофациальная пластика» ($1,9 \pm 1,14$). Заметим, что по результатам другого нашего исследования [16] именно по данным ТФ отмечался самый низкий процент оперативных вмешательств пластических хирургов.

Однако самооценка компетентности пластических хирургов в большинстве случаев объективна. Уровень объективной оценки компетентности низок: средний балл равен $2,6 \pm 1,76$ при максимально возможных 9 баллах.

Обнаруженное повышение уровня самооценки компетентности с увеличением стажа работы, к сожалению, не подтверждается объективной оценкой компетентности. Нет значимой связи уровня оценки со стажем ($r_s = -0,08$; $p = 0,3$) и уровнем самооценки ($r_s = -0,006$; $p = 0,9$). Хотя по двум ТФ «пластика носа» ($r_s = 0,27$; $p = 0,001$) и «пластика губ» ($r_s = 0,19$; $p = 0,02$) имеется значимая слабая прямая корреляция стажа и частоты верных ответов, но дальнейшие расчеты при сравнении отдельно групп «экспертов» и «без опыта» или выделении гомогенных групп не подтверждают превосходство по компетентности лиц, имеющих больший стаж. Напомним, что даже по ТФ «пластика губ», где имелось значимое превышение среднего балла правильных ответов у «экспертов», чем у лиц «без опыта» ($U = 225$, $p = 0,04$), при выделении гомогенных распределений в одну группу с «экспертами» были включены «новички», а категория «без опыта» была объединена со «знатоками». При этом уровни самооценки в целом и по отдельным ТФ значимо коррелируют со стажем работы ($p < 0,001$).

Тот факт, что респонденты без стажа или с малым стажем работы показали лучший результат по тестовым заданиям, чем респонденты со стажем работы более 10 лет, возможно, объясняется недавним прохождением теоретического курса в ординатуре. Самый высокий результат ($3,8 \pm 2,24$ балла) у респондентов, имеющих стаж 6–10 лет, свидетельствует об их наибольшей профессиональной активности.

ВЫВОДЫ

Результаты проведенного исследования, свидетельствующие о низком уровне компетентности пластических хирургов,

Таблица 3. Уровень оценки компетентности по результатам тестирования

Трудовая функция	Среднее число верных ответов в группах	
	«без опыта»	«эксперты»
Пластика уха	0,47 + 0,50	-
Пластика носа	0,29 + 0,46	-
Пластика век	0,18 + 0,39	0,20 + 0,41
Пластика губ	0,09 + 0,29	0,33 + 0,50
Пластика груди	0,28 + 0,45	0,00 + 0,00
Урогенитальная пластика	0,26 + 0,44	0,00 + 0,00
Пластика покровных тканей	0,35 + 0,48	0,00 + 0,00
Краниофациальная пластика	0,33 + 0,47	0,00 + 0,00
Хирургия руки и кисти	0,16 + 0,37	0,00 + 0,00

несоответствии показателей высокого уровня самооценки компетентности показателям ее объективной оценки, а также о депрессии уровня компетентности после 10 лет стажа, доказывают состоятельность призывов к ограниченному

допуску к реконструктивной пластической хирургии путем дискретного обучения, а также обоснованность заявлений о несовершенстве отечественной системы НМО в отношении самостоятельного составления индивидуального плана обучения.

Литература

1. Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Ст. 73 «Обязанности медицинских работников и фармацевтических работников».
2. Приказ Минздрава России от 02.06.2016 №334н «Об утверждении Положения об аккредитации специалистов».
3. Портал непрерывного медицинского и фармацевтического образования [Электронный ресурс] <https://edu.rosminzdrav.ru/o-portale/> Дата обращения 25 декабря 2017.
4. Портал непрерывного медицинского образования. Заместитель главного врача. 2016; 1: 81.
5. Приказ Минздрава России от 18.02.2013 N82 «О Координационном совете по развитию непрерывного медицинского и фармацевтического образования Министерства здравоохранения Российской Федерации».
6. Петрова И. А. Аккредитация медицинских работников: польза и риски. Бюллетень Национального НИИ общественного здоровья имени Н. А. Семашко. 2015; (4–5): 180–6.
7. Кочубей В. В. Непрерывное медицинское образование пластического хирурга в Великобритании. Московский хирургический журнал. 2017; 1: 56–9.
8. Continuing Professional Development (CPD) [Электронный ресурс] <https://www.rcseng.ac.uk/careers-in-surgery/surgeons/practicing-as-a-surgeon/continuing-professional-development> Дата обращения 25 декабря 2017.
9. Shojania KG, Silver I, Levinson W. Continuing medical education and quality improvement: a match made in heaven? *Ann Intern Med.* 2012 Feb 21; 156 (4): 305–8. DOI: 10.7326/0003-4819-156-4-201202210-00008.
10. Zolotor AJ, Randolph GD, Johnson JK, Wegner S, Edwards L, Powell C, et al. Effectiveness of a practice-based, multimodal quality improvement intervention for gastroenteritis within a Medicaid managed care network. *Pediatrics.* 2007; 120: e644–50. [PMID: 17766504].
11. Esposito P, Dal Canton A. Clinical audit, a valuable tool to improve quality of care. *General methodology and applications in nephrology. World J Nephrol.* 2014 Nov 6; 3 (4): 249–55. DOI: 10.5527/wjn.v3.i4.249.
12. GMC. Licence to practise withdrawal appeals [Электронный ресурс] <http://www.gmc-uk.org/doctors/14008.asp> Дата обращения 25 декабря 2017/.
13. Ericsson KA. Acquisition and Maintenance of Medical Expertise: A Perspective From the Expert-Performance Approach With Deliberate Practice. *Acad Med.* 2015; 90 (11): 1471–86. [PMID: 26375267].
14. Van de Wiel MW, Van den Bossche P. Deliberate practice in medicine: The motivation to engage in work-related learning and its contribution to expertise. *Vocat Learn.* 2013; 6 (1): 135–58
15. Enoch S, Jagadeesan J, Jose RM, Chan WY, McGrouth G. Plastic Surgery Exam Questions and Answers: A Guide to the Plastic Surgery exit exam, 2 ed. UK: Doctors Academy Publications, 2012. 498 ps.
16. Мантурова Н. Е., Кочубей В. В., Кочубей А. В. Характеристики деятельности пластических хирургов. Вестник РГМУ. 2017; 6: 47–51.

References

1. Federal'nyy zakon ot 21.11.2011 N 323-FZ «Ob osnovakh okhrany zdorov'ya grazhdan v Rossiyskoy Federatsii», stat'ya 73. Russian.
2. Prikaz Minzdrava Rossii ot 02.06.2016 N334n «Ob utverzhenii Polozheniya ob akkreditatsii spetsialistov». Russian.
3. Portal nepreryvnogo medicinskogo i farmacevticheskogo obrazovaniya Available at: <https://edu.rosminzdrav.ru/o-portale> Russian.
4. Portal nepreryvnogo medicinskogo obrazovaniya. Zamestitel' glavnogo vracha. 2016; 1: 81. Russian.
5. Prikaz Minzdrava Rossii ot 18.02.2013 N82 «O Koordinacionnom sovete po razvitiyu nepreryvnogo medicinskogo i farmacevticheskogo obrazovaniya Ministerstva zdavoohraneniya Rossijskoj Federacii» Russian.
6. Petrova I. A. Akkreditatsiya meditsinskikh rabotnikov: pol'za i riski. Byulleten' Natsional'nogo nauchno-issledovatel'skogo instituta obshchestvennogo zdorov'ya imeni N.A. Semashko. 2015; (4–5): 180–6. Russian.
7. Kochubey V. V. Nepreryvnoe medicinskoe obrazovanie plasticheskogo hirurga v Velikobritanii. Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal. 2017; 1: 56 –9. Russian.
8. Conntinuing Professional Development (CPD) [Elektronniy resurs] <https://www.rcseng.ac.uk/careers-in-surgery/surgeons/practicing-as-a-surgeon/continuing-professional-development> Data obrascheniya 25 dekabrja.
9. Shojania KG, Silver I, Levinson W. Continuing medical education and quality improvement: a match made in heaven? *Ann Intern Med.* 2012 Feb 21; 156 (4): 305–8. DOI: 10.7326/0003-4819-156-4-201202210-00008.
10. Zolotor AJ, Randolph GD, Johnson JK, Wegner S, Edwards L, Powell C, et al. Effectiveness of a practice-based, multimodal quality improvement intervention for gastroenteritis within a Medicaid managed care network. *Pediatrics.* 2007; 120: e644–50. [PMID: 17766504].
11. Esposito P, Dal Canton A. Clinical audit, a valuable tool to improve quality of care. *General methodology and applications in nephrology. World J Nephrol.* 2014 Nov 6; 3 (4): 249–55. DOI: 10.5527/wjn.v3.i4.249.
12. GMC. Licence to practise withdrawal appeals [Elektronniy resurs] <http://www.gmc-uk.org/doctors/14008.asp> Data obrascheniya 25 dekabrja.
13. Ericsson KA. Acquisition and Maintenance of Medical Expertise: A Perspective From the Expert-Performance Approach With Deliberate Practice. *Acad Med.* 2015; 90 (11): 1471–86. [PMID: 26375267].
14. Van de Wiel MW, Van den Bossche P. Deliberate practice in medicine: The motivation to engage in work-related learning and its contribution to expertise. *Vocat Learn.* 2013; 6 (1): 135–58.
15. Enoch S, Jagadeesan J, Jose RM, Chan WY, McGrouth G. Plastic Surgery Exam Questions and Answers: A Guide to the Plastic Surgery exit exam, 2 ed. UK: Doctors Academy Publications, 2012. 498 ps.
16. Manturova N. E., Kochubey V. V., Kochubei A. V. Harakteristiki deyatel'nosti plasticheskikh hirurov. Vestnik RGMU. 2017; 6: 47–51.

КЛИНИКО-РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ЦЕРВИКАЛЬНЫМ СИНДРОМОМ ПОСЛЕ ТРАВМЫ НАДПЛЕЧЬЯ

Е. Б. Калинин¹✉, А. В. Черняев¹, Л. Ю. Слиняков¹, А. В. Лычагин¹, Б. М. Калинин², Ю. Р. Гончарук¹

¹Кафедра травматологии, ортопедии и хирургии катастроф, лечебный факультет
Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва

²Городская клиническая больница им. С. П. Боткина, Москва

Состояние шейного отдела позвоночника (ШОП) находится во взаимосвязи с функциональным состоянием пояса верхней конечности. Повреждения пояса верхней конечности могут лежать в основе болевых ощущений в ШОП, в том числе вызывать цервикалгию. Целью исследования было оценить клиничко-рентгенологическую картину ШОП у пациентов с цервикалгией, перенесших травму плечевого пояса. В исследование вошли 400 пациентов с жалобами на цервикалгию. Интенсивность боли оценивали по визуально-аналоговой шкале (VAS), ограничения жизнедеятельности — по опроснику NDI-RU (The Neck Disability Index, Russian language). При осмотре пациентов проводили оценку профиля позвоночника и локальных изменений в ШОП. Всем лицам, включенным в исследование, было выполнено рентгенологическое обследование ШОП в боковой и передне-задней проекциях, у 49,5% пациентов проведена постуральная цифровая рентгенография позвоночника для оценки сагиттального профиля ШОП. Всем пациентам была сделана магнитно-резонансная томография (МРТ). По результатам комплексного клиничко-лучевого обследования у пациентов были отмечены функциональные изменения, которые можно трактовать как причину развития цервикалгии. С точки зрения структурно-функционального диагноза определены различные статико-динамические нарушения. Таким образом, было выявлено, что болевой синдром в области ШОП является часто встречающейся проблемой у пациентов, перенесших травму надплечья.

Ключевые слова: цервикалгия, сагиттальный баланс, позвоночник, конус экономии, рентгенография, травма верхней конечности, шейный отдел позвоночника, общее строение

✉ **Для корреспонденции:** Калинин Евгений Борисович
ул. Трубещкая, д. 8, стр. 2, г. Москва, 119991; eugene_kalinsky@mail.ru

Статья получена: 15.03.2018 **Статья принята к печати:** 24.03.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.017

CLINICAL AND RADIOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH CERVICALGIA AFTER PREVIOUS INJURY TO THE PECTORAL GIRDLE

Kalinsky EB¹✉, Chernyaev AV¹, Sliynyakov LY¹, Lychagin AV¹, Kalinsky BM², Goncharuk YuR¹

¹Chair of Trauma, Orthopedics and Disaster Surgery, Faculty of Medicine,
Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow

²Botkin Moscow State Clinical Hospital, Moscow

The health of the cervical spine (CS) and the functional state of the pectoral girdle are interdependent. Injuries to the pectoral girdle can be an underlying cause of CS pain, including cervicalgia. The aim of this study was to evaluate the condition of the cervical spine in patients with cervicalgia developed after a pectoral girdle injury using radiographic and physical examinations. The study included 400 patients complaining of cervicalgia. Pain intensity was evaluated on the visual analog scale (VAS); the impact of the condition on patients' lives was assessed using the Neck Disability Index (Russian language). During physical examinations, the general health of the spine was evaluated and abnormalities in the cervical spine were noted. All participants underwent a radiographic scan of the cervical spine in the lateral and anterior-posterior projections; 49.5% of patients underwent postural digital radiography to evaluate their CS sagittal profile. All patients received an MRI scan. Based on the results, we identified certain functional changes in the cervical spine which possibly caused cervicalgia. Structurally and functionally, the changes were divided into static and dynamic. We conclude that cervical spinal pain is a common problem among patients with previous pectoral girdle injury.

Keywords: cervicalgia, sagittal balance, spine, cone of economy, radiography, pectoral girdle injury, cervical spine, global alignment

✉ **Correspondence should be addressed:** Evgeny Kalinsky,
Trubetskaya 8, bl. 2, Moscow, 119991; eugene_kalinsky@mail.ru

Received: 15.03.2018 **Accepted:** 24.03.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.017

В последнее десятилетие все большее значение уделяется структурно-функциональным нарушениям позвоночника как причине развития различных болевых синдромов не только аксиальной, но и периферической локализации. С биомеханической точки зрения позвоночник и пояс верхних и нижних конечностей можно рассматривать как сложную «вантовую» систему [1, 2]: позвоночник, занимая центральное положение, играет роль мачты,

которая уравнивается сбалансированной работой вант (плечевой пояс, таз, мышцы спины и конечностей). Изменение пространственной ориентации любого из звеньев этой биомеханической системы приводит к изменениям в положении и функционировании других частей. Цель адаптационных изменений — обеспечение эргономичной работы, т. е. сохранение постурального баланса туловища в пределах «конуса экономии» по

Dubouset (рис. 1) [3–6]. Таким образом, функциональные состояния шейного отдела позвоночника (ШОП) и пояса верхней конечности следует рассматривать как взаимосвязанные [1, 3, 7, 8].

Повреждения пояса верхней конечности довольно распространены и в современной травматологической практике встречаются примерно в 15% всех случаев возникновения скелетных травм [9]. Наиболее часто они возникают у пациентов молодого трудоспособного возраста в результате бытовых, спортивных, дорожно-транспортных травм.

Анализ результатов лечения лиц, поступивших с травмой плечевого пояса, позволяет выделить группу пациентов с синдромом цервикалгии. Данная группа гетерогенна и включает в себя пациентов разного возраста, проходивших как консервативное, так и оперативное лечение. Особый интерес представляют пациенты молодого и среднего возраста, не имевшие клинической картины цервикалгии до получения травмы. Развитие цервикального болевого синдрома приводит к формированию функциональных ограничений, снижает скорость и интенсивность реабилитации, ухудшает качество жизни пациентов [7]. Стоит отметить, что в настоящий момент в литературе отсутствуют статистически достоверные данные как о распространенности этого синдрома у пациентов с последствиями травмы плечевого пояса, так и о причинах его развития.

Целью исследования была оценка клинорентгенологической картины ШОП у пациентов с цервикалгией, перенесших травмы плечевого пояса.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 400 пациентов, проходивших лечение на клинической базе травматологических отделений ГКБ им. С. П. Боткина кафедры травматологии, ортопедии и хирургии катастроф Первого МГМУ им. И. М. Сеченова в период с 2015 по 2018 г. Критерии включения: локальная боль в шее (клиническая картина цервикалгии) у пациентов мужского и женского пола;

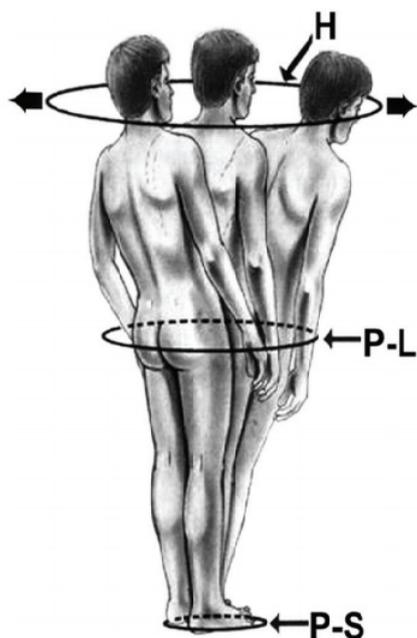


Рис. 1. Схема оптимальной позы человека с позициями концепции «конуса экономии» [3]

возраст от 18 до 59 лет (средний возраст $41,3 \pm 1,1$); изолированная травма одного надплечья в анамнезе (не менее 6 недель с момента получения).

Критерии исключения: клиническая картина цервикобрахиалгии с радикальным синдромом; травма любого отдела позвоночника в анамнезе, стеноз спинномозгового канала ШОП различной этиологии; сочетанная травма.

Распределение пациентов по полу и возрасту представлено в табл. 1.

Хирургическое лечение пациентов было выполнено в 276 случаях (69%), консервативное — в 124 (31%).

Всем пациентам проведена клиническая оценка ортопедического статуса. Интенсивность боли оценивали по визуально-аналоговой шкале (VAS) [10, 11].

Оценку ограничения жизнедеятельности проводили по опроснику NDI-RU [12–14].

Рентгенографию ШОП выполняли в стандартных передне-задней и боковой проекциях (100%). Функциональную рентгенографию ШОП не проводили в связи с низкой информативностью, обусловленной наличием болевого синдрома у пациентов и невозможностью проведения исследования хотя бы в относительно идентичных условиях.

Для оценки состояния сагиттального профиля ШОП в 198 случаях (49,5%) провели постуральную цифровую рентгенографию позвоночника в боковой и передне-задней проекциях [5]. Исследование позволяет оценить не только шейный баланс, но и так называемый global alignment (рис. 2) [7, 15–20].

Для оценки состояния межпозвонковых дисков, исключения стеноза спинномозгового канала ШОП всем пациентам проводили МРТ по стандартному протоколу Pfirrmann (в режимах T1, T2, STIR на томографах закрытого контура 1,5 Тесла) [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все пациенты предъявляли жалобы на боли в шее. Интенсивность боли по VAS имела следующие значения: легкая боль — 18 пациентов (4,5%), умеренная боль — 312 пациентов (78%), сильная и нестерпимая боль — 70 пациентов (17,5%). Среднее значение интенсивности боли по VAS составило $5,6 \pm 0,45$ балла.

По результатам анкетирования с применением опросника NDI-RU легкие нарушения жизнедеятельности выявлены у 85 пациентов (21,3%), умеренные — у 290 (72,5%), сильные — у 25 (6,2%).

При осмотре пациентов проводили оценку профиля позвоночника в целом и локальных изменений в ШОП, в частности, а также объема движений ШОП (табл. 2).

При анализе рентгенограмм выявлены следующие локальные симптомы (табл. 3).

Деформации оси ШОП во фронтальной плоскости выявлено не было.

Результаты постуральной цифровой рентгенографии при оценке сагиттального баланса шеи представлены в табл. 4.

Таблица 1. Распределение по полу и возрасту

	Мужчины	Женщины
18–44	125 (31,3%)	101 (25,2%)
45–59	88 (22%)	86 (21,5%)
Всего	213 (53,3%)	187 (46,7%)

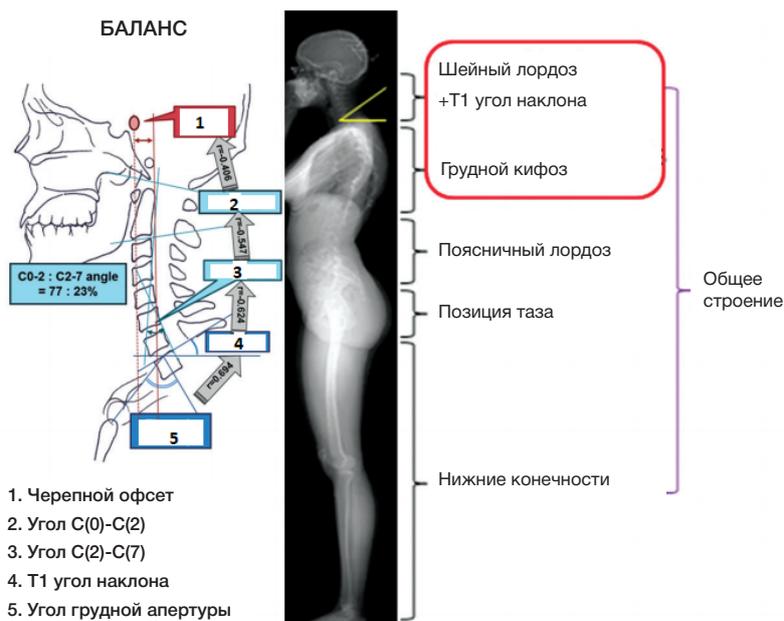


Рис. 2. Рентгенологические параметры сагиттального баланса [15, 19, 20]

Таблица 2. Результаты клинического осмотра пациентов

Симптом	Количество пациентов
Оценка профиля позвоночника	
Плоская спина (сглаженность шейного и поясничного лордозов, грудного кифоза)	98 (24,5%)
Круглая спина (усиленный грудной кифоз)	47 (11,7%)
Плоско-вогнутая спина (усиленный грудной кифоз и поясничный лордоз)	29 (7,3%)
Грудо-поясничный сколиоз	247 (61,8%)
Перекокс таза	198 (49,5%)
Локальные изменения ШОП	
Усиленный шейный лордоз	186 (46,5%)
Сглаженный шейный лордоз	199 (49,8%)
Повышенный тонус паравертебральных мышц	359 (89,3%)
Ограничение флексии	373 (93,3%)
Ограничение экстензии	340 (85%)
Ограничение ротации	381 (95,3%)
Ограничение боковой флексии	391 (97,8%)

Таблица 3. Результаты рентгенографического исследования

Рентгенологический симптом	Количество (%)
Снижение высоты межпозвоночных дисков (относительное сравнение с дисками смежных сегментов)	49 (12,3%)
«Лестничная» нестабильность тел позвонков (нарушение непрерывности линии, проведенной по задней стенке тел позвонков)	273 (68,3%)
Артроз дугоотростчатых суставов	23 (5,8%)
Локальное отклонение остистого отростка	379 (94,8%)
Инклинация суставных отростков (смещение суставных поверхностей дугоотростчатых суставов с нарушением линии Хедли)	367 (91,8%)
Спондилез	12 (3%)

После проведения МРТ у всех пациентов были выявлены признаки дегенеративных изменений межпозвоночных дисков ШОП I и II типов по Pfirrmann [21], дегенеративных изменений тел позвонков не обнаружено. Признаки стеноза спинномозгового канала в исследуемой группе пациентов отсутствовали.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследование было включено 400 пациентов, перенесших травму надплечья, с клинической картиной

цервикального болевого синдрома, развившегося в посттравматическом периоде. Клиническая картина во всех случаях складывалась из локального болевого синдрома, миофасциального синдрома, ограничения подвижности в ШОП. Рентгенологическое исследование не выявило у пациентов грубые дегенеративно-дистрофические изменения. При проведении в 198 случаях (49,5%) оценки сагиттального баланса ШОП не было выявлено грубых биомеханических нарушений, что свидетельствует о локальных причинах болевого синдрома. Данные МРТ свидетельствуют о наличии

Таблица 4. Параметры шейного баланса

Параметр	Полученное значение	Усредненный показатель [1, 15, 18]
Угол C0-C2	$-29^\circ \pm 1,3^\circ$	-30°
Угол C2-C7	$-9,8^\circ \pm 0,9^\circ$	$-9,6$
T1S (T1 slope – угол наклона T1 позвонка)	$38,9^\circ \pm 1,2^\circ$	40°
C2-C7 SVA (сагиттальная вертикальная ось)	$3,9 \pm 0,5$ см	4 см
TIA (thoracic inlet angle – угол входа в грудную клетку)	$43^\circ \pm 1,4^\circ$	44°

у пациентов начальных стадий дегенеративно-дистрофических изменений позвоночно-двигательных сегментов без признаков диск-радикулярных конфликтов и стенозирования спинномозгового и латеральных каналов. Таким образом, выявленные у пациентов изменения не относятся к структурным и носят функциональный характер. С точки зрения функционального диагноза определяются различные статико-динамические нарушения (гипермобильность, гипомобильность позвоночно-двигательных сегментов), что в целом можно трактовать как дислокационный функциональный синдром в рамках фасет-синдрома (синдром дугоотростчатых суставов, facet joint syndrome) [22, 23].

В зависимости от выявленных статико-динамических изменений пациентам можно рекомендовать соответствующий план реабилитационного лечения с целью купирования цервикального болевого синдрома.

Однако необходимо дальнейшее исследование для определения степени корреляции выявленных изменений с различными видами повреждений надплечья и типов их хирургического лечения, а также другими структурно-функциональными нарушениями позвоночника и таза.

ВЫВОДЫ

Болевой синдром в области ШОП является часто встречающейся проблемой у пациентов, перенесших травму надплечья. Повреждения надплечья могут приводить к развитию функциональных нарушений ШОП, являющихся причиной цервикалгии. Дальнейшее изучение функциональных нарушений ШОП у пациентов, перенесших травмы надплечья, позволит разработать методы профилактики этих нарушений и сформировать схемы восстановительного лечения.

Литература

- Капанджи А. И. Позвоночник. Физиология суставов. 6 изд. М.: Изд-во «Эксмо»; 2009. 327 с.
- Dubousset J, Challier V, Farcy JP, Schwab FJ, Lafage V. Spinal alignment versus spinal balance. In: Haid RW, Schwab FJ, Shaffrey CI, Youssef JA (ed.). Global Spinal Alignment: Principles, Pathologies, and Procedures St. Louis, MO: Quality Medical Publishing, 2014. p. 3–9.
- Dubousset J. Three-dimensional analysis of the scoliotic deformity. In: The pediatric spine: principles and practice. New York: Raven Press; 1994: 479–496.
- Hasegawa K, Okamoto M, Hatsushikano S, Shimoda H, Ono M, Watanabe K. Normative values of spino-pelvic sagittal alignment, balance, age, and health-related quality of life in a cohort of healthy adult subjects. *Eur Spine J*. 2016; 25 (11): 3675–86. <https://doi.org/10.1007/s00586-016-4702-2>
- Mac-Thiong JM, Roussouly P, Berthonnaud E, Guigui P. Sagittal parameters of global spinal balance: normative values from a prospective cohort of seven hundred nine Caucasian asymptomatic adults. *Spine*. 2010; 35 (22): E1193–E1198. <https://doi.org/10.1097/brs.0b013e3181e50808>
- Ames CP, Smith JS, Scheer JK, Bess S, Bederman SS, Deviren V et al. Shaffrey Impact of spinopelvic alignment on decision making in deformity surgery in adults: A review. *J Neurosurg Spine*. 2012; 16 (6): 547–64. <https://doi.org/10.3171/2012.2.SPINE11320>
- Бурцев А. В., Рябых С. О., Котельников А. О., Губин А. В. Клинические аспекты сагиттального баланса у взрослых. *Гений ортопедии*. 2017; 23 (2): 228–35. <https://doi.org/10.18019/1028-4427-2017-23-2-228-235>
- Калинский Е. Б., Калинский Б. М., Гончарук Ю. Р., Усманова Н. Х. Подходы к лечению повреждений акромиально-ключичного сустава III типа (по Rockwood). *Мануальная терапия*. 2017; 66 (2): 65–68.
- Котельников Г. П., Миронов С. П., редакторы. *Травматология. Национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008: 808 с.
- Scott J, Huskisson EC. Vertical or horizontal visual analogue scales. *Ann Rheum Dis*. 1979; 38: 560.
- Gould D. et al. Visual Analogue Scale (VAS). *Journal of Clinical Nursing* 2001; 10: 697–706.
- Vernon H, Mior, S. (1991). The Neck Disability Index: A study of reliability and validity. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 14 (7): 409–15.
- Bakhtadze MA, Vernon H, Zakharova OB, Kuzminov KO, Bolotov DA. The Neck Disability Index-Russian Language Version (NDI-RU): A Study of Validity and Reliability. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2015 Jul 15; 40 (14): 1115–1. DOI: 10.1097/BRS.0000000000000880.
- Бывальцев В. А., Белых Е. Г., Алексеева Н. В., Сороковиков В. А. Применение шкал и анкет в обследовании пациентов с дегенеративным поражением поясничного отдела позвоночника: методические рекомендации. Иркутск: ФГБУ "НЦПВХ" СО РАМН, 2013. 32 с.
- Scheer JK., Tang JA, Smith JS, Acosta Jr FL, Protopsaltis TS, Blondel B et al. Cervical spine alignment, sagittal deformity, and clinical implications: a review. *J Neurosurg Spine*. 2013; 19 (2): 141–159. <https://doi.org/10.3171/2013.4.SPINE12838>
- Ozer AF, Kaner T, Bozdoğan Ç. Sagittal Balance in the Spine. *Turkish Neurosurgery*. 2014; 24 (1): 13–19.
- Le Huec JC, Demezon H, Aunoble S. Sagittal parameters of global cervical balance using EOS imaging: normative values from a prospective cohort of asymptomatic volunteers. *Eur Spine J*. 2015; 24 (1): 63–71. <https://doi.org/10.1007/s00586-014-3632-0>
- Liu S, Schwab F, Smith JS, Klineberg E, Ames CP, Mundis G et al. Likelihood of reaching minimal clinically important difference in adult spinal deformity: a comparison of operative and nonoperative treatment. *Ochsner J*. 2014; 14 (1): 67–77.
- Vialle R, Levassor N, Rillardon L, Templier A, Skalli W, Guigui P. Radiographic analysis of the sagittal alignment and balance of the spine in asymptomatic subjects. *J Bone Joint Surg Am*. 2005; 87 (2): 260–7.
- Lafage V, Schwab F, Skalli W, Hawkinson N, Gagey PM, Ondra S et al. Standing balance and sagittal plane spinal deformity: analysis of spinopelvic and gravity line parameters. *Spine*. 2008; 33 (14): 1572–78. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31817886a2>
- Pfirrmann CW, Metzendorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N.

- Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001 Sep 1; 26 (17): 1873–8.
22. Авоян Т. К. Консервативное лечение больных с синдромом межпозвоноковых суставов при поясничном остеохондрозе [диссертация]. М.: 1998.
23. Жандаров К. А. Стеноз межпозвоночных каналов шейного отдела позвоночника [диссертация]. М.: 2016.

References

- Kapandzhi AI. *Pozvonochnik. Fiziologiya sustavov*. 6 izd. M.: Izdatel'stvo Eksmo; 2009: 327 s.
- Dubousset J, Chailier V, Farcy JP, Schwab FJ, Lafage V. Spinal alignment versus spinal balance. In: Haid RW, Schwab FJ, Shaffrey CI, Youssef JA (ed.). *Global Spinal Alignment: Principles, Pathologies, and Procedures*. St. Louis, MO: Quality Medical Publishing, 2014. p. 3–9.
- Dubousset J. Three-dimensional analysis of the scoliotic deformity. In: *The pediatric spine: principles and practice*. New York: Raven Press; 1994: 479–496.
- Hasegawa K, Okamoto M, Hatsushikano S, Shimoda H, Ono M, Watanabe K. Normative values of spino-pelvic sagittal alignment, balance, age, and health-related quality of life in a cohort of healthy adult subjects. *Eur Spine J*. 2016; 25 (11): 3675–86. <https://doi.org/10.1007/s00586-016-4702-2>
- Mac-Thiong JM, Roussouly P, Berthonnaud E, Guigui P. Sagittal parameters of global spinal balance: normative values from a prospective cohort of seven hundred nine Caucasian asymptomatic adults. *Spine*. 2010; 35 (22): E1193–E1198. <https://doi.org/10.1097/brs.0b013e3181e50808>
- Ames CP, Smith JS, Scheer JK, Bess S, Bederman SS, Deviren V et al. Shaffrey Impact of spinopelvic alignment on decision making in deformity surgery in adults: A review. *J Neurosurg Spine*. 2012; 16 (6): 547–64. <https://doi.org/10.3171/2012.2.SPINE11320>
- Burtsev AV, Ryabykh SO, Kotel'nikov AO, Gubin AV. Klinicheskie aspekty sagittal'nogo balansa u vzroslykh. *Genii ortopedii*. 2017; 23 (2): 228–35. <https://doi.org/10.18019/1028-4427-2017-23-2-228-235>
- Kalinsky EB, Kalinsky BM, Goncharuk JuR, Usmanova NH. Podhody k lecheniju povrezhdenij akromial'no-kljuchichnogo sustava III tipa (po Rockwood). *Manual'naja terapija*. 2017; 66 (2): 65–8.
- Kotel'nikov GP, Mironov SP, redactory. *Travmatologiya. Natsional'noe rukovodstvo*. M.: GEOTAR-Media; 2008: 808.
- Scott J, Huskisson EC. Vertical or horizontal visual analogue scales. *Ann Rheum Dis*. 1979; 38: 560.
- Gould D et al. Visual Analogue Scale (VAS). *Journal of Clinical Nursing* 2001; 10: 697–706.
- Vernon H, Mior S. (1991). The Neck Disability Index: A study of reliability and validity. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*. 14 (7): 409–15.
- Bakhtadze MA, Vernon H, Zakharova OB, Kuzminov KO, Bolotov DA. The Neck Disability Index-Russian Language Version (NDI-RU): A Study of Validity and Reliability. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2015 Jul 15; 40 (14): 1115–1. DOI: 10.1097/BRS.0000000000000880.
- Bivalentsev VA, Belikh EG, Alekseeva NV, Sorokovikov VA. Primenenie shkal I anket v obsledovanii patsientov s degenerativnim porazheniem poyasnichnogo otdela pozvonochnika; metodicheskie rekomendatsii. Irkutsk: 2013. 32 s.
- Scheer JK., Tang JA, Smith JS, Acosta Jr FL, Protopsaltis TS, Blondel B et al. Cervical spine alignment, sagittal deformity, and clinical implications: a review. *J Neurosurg Spine*. 2013; 19 (2): 141–159. <https://doi.org/10.3171/2013.4.SPINE12838>
- Ozer AF, Kaner T, Bozdoğan Ç. Sagittal Balance in the Spine. *Turkish Neurosurgery*. 2014; 24 (1): 13–19.
- Le Huec JC, Demezon H, Aunoble S. Sagittal parameters of global cervical balance using EOS imaging: normative values from a prospective cohort of asymptomatic volunteers. *Eur Spine J*. 2015; 24 (1): 63–71. <https://doi.org/10.1007/s00586-014-3632-0>
- Liu S, Schwab F, Smith JS, Klineberg E, Ames CP, Mundis G et al. Likelihood of reaching minimal clinically important difference in adult spinal deformity: a comparison of operative and nonoperative treatment. *Ochsner J*. 2014; 14 (1): 67–77.
- Vialle R, Levassor N, Rillardon L, Templier A, Skalli W, Guigui P. Radiographic analysis of the sagittal alignment and balance of the spine in asymptomatic subjects. *J Bone Joint Surg Am*. 2005; 87 (2): 260–7.
- Lafage V, Schwab F, Skalli W, Hawkinson N, Gagey PM, Ondra S et al. Standing balance and sagittal plane spinal deformity: analysis of spinopelvic and gravity line parameters. *Spine*. 2008; 33 (14): 1572–78. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31817886a2>
- Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001 Sep 1; 26 (17): 1873–8.
- Avoyan TK. *Konservativnoe lechenie bol'nih s sindromom mezhpозvonkovih sustavov pri poyasnichnom osteohondroze* [dissertacija]. M.: 1998.
- Zhandarov KA. *Stenoz mezhpозvonochnix kanalov sheinogo otdela pozvonochnika*. [dissertacija]. M.: 2016.

АЛГОРИТМ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С РАССЕКАЮЩИМ ОСТЕОХОНДРИТОМ КОЛЕННОГО СУСТАВА

К. А. Егиазарян, Г. Д. Лазишвили[✉], И. В. Храменкова, М. А. Шпак, Д. А. Бадриев

Кафедра травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова

Наиболее часто рассекающий остеохондрит коленного сустава, или болезнь Кёнига, встречается у активных молодых людей, занятых физическим трудом, спортом, т. е. представителей социально активной прослойки населения. Несмотря на разнообразие современных методик хирургического лечения болезни, остается много спорных вопросов по их применению, отсутствует оптимальный подход и ограничена доступность качественных биоматериалов, требующихся при вмешательстве. Проведенный анализ результатов лечения пациентов за несколько лет показал высокую актуальность и необходимость решения многих вопросов этой проблемы. В работе представлен алгоритм хирургического лечения рассекающего остеохондрита коленного сустава. Обоснованы показания к оперативному вмешательству, предложены оптимальные способы коррекции локальных дефектов хряща в зависимости от стадии его поражения и возраста пациента, даны рекомендации, основанные на практическом опыте авторов.

Ключевые слова: локальные дефекты хряща, коленный сустав, рассекающий остеохондрит, болезнь Кёнига, костно-хрящевой дефект, коллагеновая матрица, «мозаичная» костно-хрящевая аутотрансплантация

✉ **Для корреспонденции:** Гурам Давидович Лазишвили
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; guramlaz@gmail.com

Статья получена: 16.05.18 **Статья принята к печати:** 23.05.18

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.020

KNEE OSTEOCHONDRITIS DESICCANS: SURGERY ALGORITHM

Egjazaryan KA, Lazishvili GD[✉], Hramenkova IV, Shpak MA, Badriev DA

Department of Traumatology, Orthopedics and Military Field Surgery,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Knee osteochondritis desiccans, or Koenig's disease, is commonly found in active young people engaged in manual labor, sports etc., i.e. socially active population. Today, we have a good number of surgical method to treatment of this disorder; however, there is still much controversy about their application, and no single approach is considered to be the optimal one. Plus, high-quality biomaterials required for the intervention are sometimes unavailable. The analysis of the results of treatment of patients (spanning several years) proved urgency of the problem and highlighted the necessity to solve a number of related issues. This paper presents the algorithm of surgical treatment of knee osteochondritis desiccans. We have provided surgery validation criteria, suggested optimal methods of correction of local cartilage defects (depending on the degree of damage and patient's age) and outlined some recommendations based on our practical experience.

Keywords: local cartilage defects, knee joint, osteochondritis dissecans, Koenig's disease, osteochondral defect, collagen scaffold, mosaic plastic

✉ **Correspondence should be addressed:** Guram Davidovich Lazishvili
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; guramlaz@gmail.com

Received: 16.05.18 **Accepted:** 23.05.18

DOI: 10.24075/brsmu.2018.020

Лечение патологии внутрисуставного гиалинового хряща является актуальной проблемой в ортопедии, а хирургическая коррекция локальных хрящевых дефектов на сегодняшний день одна из труднейших задач для врача.

Частота встречаемости рассекающего остеохондрита мыщелков бедренных костей, или болезни Кёнига, среди всех заболеваний коленного сустава достигает 2%. Патология распространена в основном в возрастных группах 11–13 и 20–40 лет.

Ежегодно в Европе проводится более 300 тыс. операций по коррекции локальных внутрисуставных хрящевых дефектов коленного сустава [1]. Многие применяемые ранее методы хирургического лечения заболевания (рефиксация хрящевой пластины, туннелизация субхондральной кости и др.) довольно устарели и оказались малоэффективными.

В 80–85% случаев зона рассекающего остеохондрита находится в области медиального мыщелка бедра, в 10–20% случаев — в области латерального мыщелка бедра, в 4% случаев — на суставной поверхности надколенника

и в 0,5–0,7% — в области межмышцелковой борозды бедренной кости. В 14–24% случаев болезнь Кёнига носит двусторонний характер [2].

Не до конца понятны причины, вызывающие поражение хряща при рассекающем остеохондрите. Среди них могут быть конституциональные и генетические факторы, ишемия, травма, болезнь перегрузки, нарушения процесса оссификации и др [3]. Возможно, что в основе патогенеза болезни Кёнига лежат ишемия и локальный некроз субхондральной кости с распространением на хрящевую ткань. Прогрессируя, рассекающий остеохондрит приводит к отделению нежизнеспособного субхондрального фрагмента и выпадению его в полость сустава.

Несмотря на разнообразие предложенных методик хирургического лечения болезни Кёнига, в том числе с применением результатов развития биотехнологии, остается много спорных вопросов [4–8]. Не прекращаются дискуссии по поводу необходимости одномоментного выполнения и костной, и хрящевой пластики. Отсутствие

единого мнения и стандартов создает сложности в обосновании выбора тактики лечения больных с болезнью Кёнига, особенно у пациентов юношеского возраста с незакрытой зоной роста.

К сожалению, в настоящее время спектр возможностей отечественных хирургов при лечении больных с рассекающим остеохондритом крайне ограничен. Это связано с недоступностью широкого применения многих возможностей современных био- и клеточных технологий. Отсутствие отечественных аналогов и высокая стоимость импортных биоматериалов определяют экономическую нецелесообразность их использования в отечественных клиниках.

Анализ отдаленных исходов лечения больных с рассекающим остеохондритом коленного сустава по методике костно-хрящевой аутотрансплантации («мозаичной» хондропластики), традиционно применяемой в настоящее время во многих отечественных клиниках, показал ее недостатки: частую невозможность полноценного восстановления конгруэнтности суставных поверхностей, как и самого дефекта; возникновение проблем в области патело-фemorального сочленения. Одна из основных причин затруднений, возникающих интраоперационно при лечении обширных костно-хрящевых дефектов мыщелков бедренных костей, — это дефицит пластического материала.

В данной работе представлены обоснование выбора и алгоритм оптимальной тактики хирургического лечения рассекающего остеохондрита мыщелков бедренных костей в зависимости от стадии поражения хряща.

Дизайн исследования

Для обоснования выбора и создания алгоритма оптимальной тактики лечения был проведен анализ результатов лечения 184 больных с разнообразными хроническими полнослойными локальными хрящевыми и костно-хрящевыми повреждениями коленного сустава, прооперированных за период с 1995 по 2017 гг. в ГКБ № 1 им. Н. И. Пирогова.

Всех пациентов разделили на основную и контрольную группы. Пациентам первой группы в составе 86 человек были применены современные методики хирургической коррекции локальных дефектов хряща (моно или «мозаичная» костно-хрящевая ауто- или аллотрансплантация, технология индуцированного на матрице аутохондрогенеза, или технология AMIC, — имплантация коллагеновой матрицы с костной пластикой и без нее) [1, 2].

Контрольную группу составили 98 пациентов, прошедшие лечение по старым методикам коррекции локальных дефектов хряща (абразивная хондропластика, формирование микропереломов субхондральной кости, туннелизация) [2–5, 6].

Давность заболевания оценивалась со слов больных во время сбора анамнеза, а именно с момента появления первых жалоб до постановки диагноза.

В качестве методов исследования и оценки результатов применяли клинко-функциональное обследование, магнитно-резонансную томографию (МРТ) и мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ), в пред- и послеоперационном периодах выполняли сравнительную оценку шкал: физической активности ICRS (ICRS — Международное общество по восстановлению хряща), BALL (визуально-аналоговая шкала) и функционального состояния коленного сустава WOMAC [2].

Для исследования и оценки результатов при анализе выполненных компьютерных томограмм коленного сустава использовали шкалу Хаунсфилда. Оценку изображений, полученных при МРТ, делали по шкале MOCART [9–11].

Критерии включения в исследование: мужчины и женщины от 15 до 60 лет (средний возраст $40 \pm 1,6$ лет), наличие хронических полнослойных хрящевых дефектов коленного сустава 3-й и 4-й стадии по классификации ICRS.

Критерии исключения: мужчины и женщины иного возраста, наличие свежих повреждений хряща, неполнослойный характер дефекта (1-я и 2-я стадии по классификации ICRS).

Отдаленные результаты лечения (до 8 лет) были изучены нами у 70 больных (81,4%) основной группы и 78 больных (79,6%) контрольной группы. Результаты изучены не у всех пациентов по причине недоступности ряда больных для контакта и малых сроков, прошедших с момента операции.

Ниже представлен разработанный нами алгоритм хирургического лечения больных с рассекающим остеохондритом коленного сустава, сформулированным нами на основании выполненного исследования и применяемый в нашей клинике.

Хирургическая коррекция рассекающего остеохондрита коленного сустава

1. Пациенты с незакрытой зоной роста

В настоящее время для отечественных клиник доступно проведение нескольких вариантов хирургической коррекции локальных костно-хрящевых дефектов мыщелков бедренной кости, межмыщелковой борозды, надколенника.

Выполнение костно-хрящевой трансплантации пациентов юношеского возраста с незакрытой зоной роста, на наш взгляд, нецелесообразно. Так же бесперспективна и рефиксация отделившейся некротизированной костно-хрящевой пластины. Имплантация коллагеновой матрицы (технология AMIC) на некротизированную субхондральную кость не приведет к ее регенерации. Нами верифицировано прогрессирующее разрушение субхондральной кости при применении технологии AMIC без костной пластики. Более подробно об этой технологии см. ниже.

Таким образом, методом выбора у пациентов данной возрастной группы остается методика создания сверлом туннелей в субхондральной кости, основанная на репаративной способности мезенхимальных стволовых клеток, поступающих через выполненные отверстия [12]. В последние годы данную манипуляцию мы выполняем артроскопическим способом сверлом диаметром 3,5 мм с треугольной заточкой на конце и ограничителем глубины погружения в кость до 15 мм (рис. 1).

2. Пациенты с закрытой зоной роста

«Мозаичная» костно-хрящевая аутотрансплантация

У пациентов с закрытой зоной роста, у которых площадь костно-хрящевого дефекта не превышает 10 см^2 , мы рекомендуем отдавать предпочтение «мозаичной» костно-хрящевой аутотрансплантации.

Важно еще на этапе предоперационного планирования определить возможность проведения полноценной костно-хрящевой аутотрансплантации артроскопическим

способом. Далеко не всегда удается артроскопически произвести полноценный забор донорских столбиков-трансплантатов, «мозаичную» пластику и восстановление конгруэнтности суставной поверхности [13, 14]. Как правило, это связано с ограниченными возможностями манипулирования в суставе инструментами через артроскопические доступы. В таких случаях более правильно выполнять «мозаичную» хондропластику открытым или мини-инвазивным способом [15].

Необходимо остановиться на одной важной детали в технике выполнения операции: на расположении трансплантатов. Для полноценного хондрогенеза и регенерации хрящевой поверхности дефекта, трансплантаты необходимо располагать максимально близко друг к другу, практически вплотную или с небольшим «нахлестом» на соседний столбик-трансплантат.

Через 12 месяцев после оперативного лечения на выполненных контрольных компьютерных томограммах отмечалась хорошая костная и хрящевая регенерация в зоне «мозаичной» пластики (рис. 2).

В случаях, когда площадь костно-хрящевого дефекта превышала 10 см², до начала 2017 г. мы отдавали предпочтение «мозаичной» костно-хрящевой аллотрансплантации. В качестве донорского алломатериала использовали лиофилизированные консервированные мыщелки бедренных костей. Стерилизацию алломатериалов проводили гамма-излучением. Техника операции и расположение столбиков-трансплантатов были аналогичными, как и при костно-хрящевой аутоотрансплантации (рис. 3).

Такая методика операции, на наш взгляд, имеет ряд преимуществ. Отсутствие необходимости забора аутологических донорских столбиков-трансплантатов из боковых отделов коленного сустава значительно снижает время выполнения и травматичность операции. При небольших по площади поражениях мыщелка эту операцию можно выполнять и артроскопическим способом. Не возникает проблем с дефицитом пластического материала,

что позволяет выполнить полноценную пластику костно-хрящевого дефекта с использованием аллотрансплантатов разного диаметра. Нет необходимости использовать биоматериалы, что значительно снижает стоимость операции. Эту технологию можно использовать при любой локализации костно-хрящевого дефекта в коленном суставе и не только в нем [16].

В настоящее время мы широко применяем комбинированную (ауто- и алло-) «мозаичную» костно-хрящевую трансплантацию (рис. 4). Анализ ее исходов показал более качественную регенерацию субхондральной кости и хрящевой поверхности мыщелка бедра.

Представим несколько наших рекомендаций по использованию методики костно-хрящевой трансплантации:

- для полноценной пластики костно-хрящевого дефекта целесообразно использовать трансплантаты диаметром не менее 5–6 мм;

- для достижения полноценной регенерации необходимо столбики-трансплантаты располагать вплотную друг к другу или с небольшим «нахлестом» с соседним столбиком трансплантатом;

- при костно-хрящевом дефекте площадью более 10 см² необходимо еще на этапах предоперационного планирования адекватно оценить возможность полноценной пластики дефекта. При риске дефицита аутопластического материала оптимально выполнять комбинированную ауто- и аллопластику дефекта.

Техника формирования микропереломов в субхондральной кости по Стедману

С 2002 по 2005 годы при 3-й стадии локального поражения хряща контактных зон мыщелков бедренной кости, не превышающего 5 см², мы широко использовали технику формирования микропереломов в субхондральной кости по Стедману [2, 4, 5]. Методика основана на стимуляции хондрогенеза стволовыми клетками, полученными через

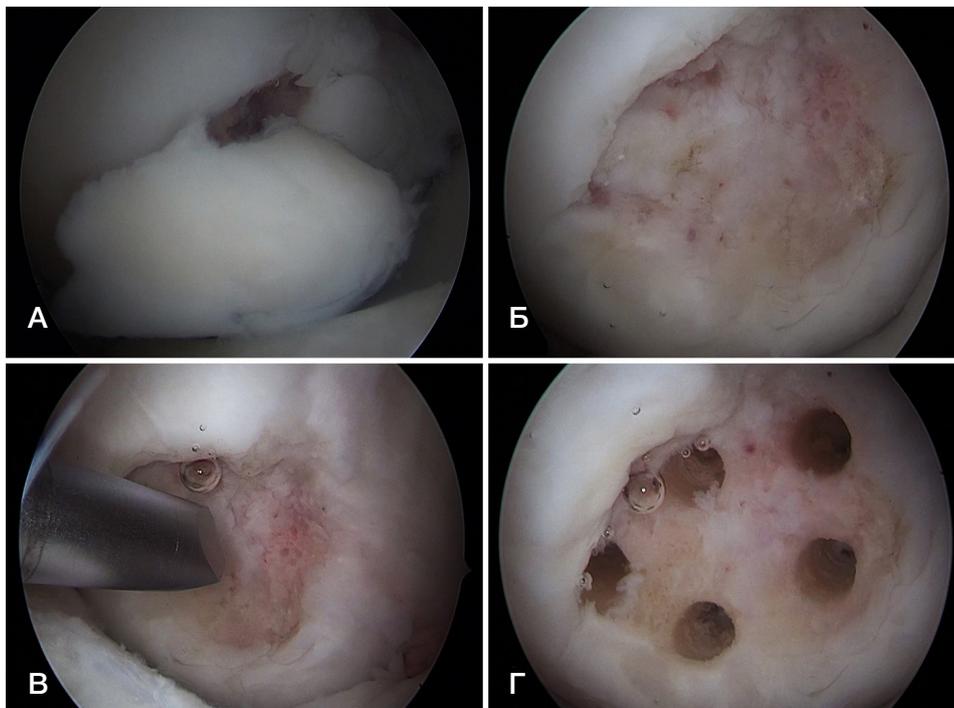


Рис. 1. А. Артроскопическая картина отделившейся некротизированной хрящевой пластины. Б. Артроскопический вид костно-хрящевого дефекта после удаления некротизированной пластины. В. Формирование туннелизационных отверстий в субхондральной кости. Г. Субхондральная кость после туннелизации

сформированные отверстия. Анализ результатов этих операций показал бесперспективность их выполнения в связи с отсутствием желаемого эффекта, в частности восстановления хрящевой ткани на пораженном участке. Отрицательные исходы операций еще раз доказывают, что для нормального хондрогенеза стволовые клетки должны быть фиксированы в зоне дефекта хряща в виде суперсгустка.

Методика индуцированного на матрице аутохондрогенеза (AMIC)

В последние годы для лечения полнслойных дефектов хряща все большую популярность приобретает методика индуцированного на матрице аутохондрогенеза (AMIC) (рис. 5). В ее основе лежит описанная выше репаративная способность мезенхимальных стволовых клеток, выходящих

в полость сустава через отверстия, выполненные сверлом в субхондральной кости [17–22].

В результате туннелизации образуется «суперсгусток» из цитокинов и стволовых клеток красного костного мозга, который благодаря имплантации на костно-хрящевой дефект матрицы становится стабильным, стимулируя восстановление костной и формирование хрящеподобной ткани [23, 24].

Преимущества технологии индуцированного на матрице аутохондрогенеза очевидны: малоинвазивность процедуры; возможность восстановления крупных дефектов хряща; простота хирургической техники; доказанная эффективность: у пациентов снижалась интенсивность болевого синдрома, а в ряде случаев он полностью проходил и восстанавливалась функция коленного сустава, что в результате увеличивало удовлетворенность больных результатами лечения.

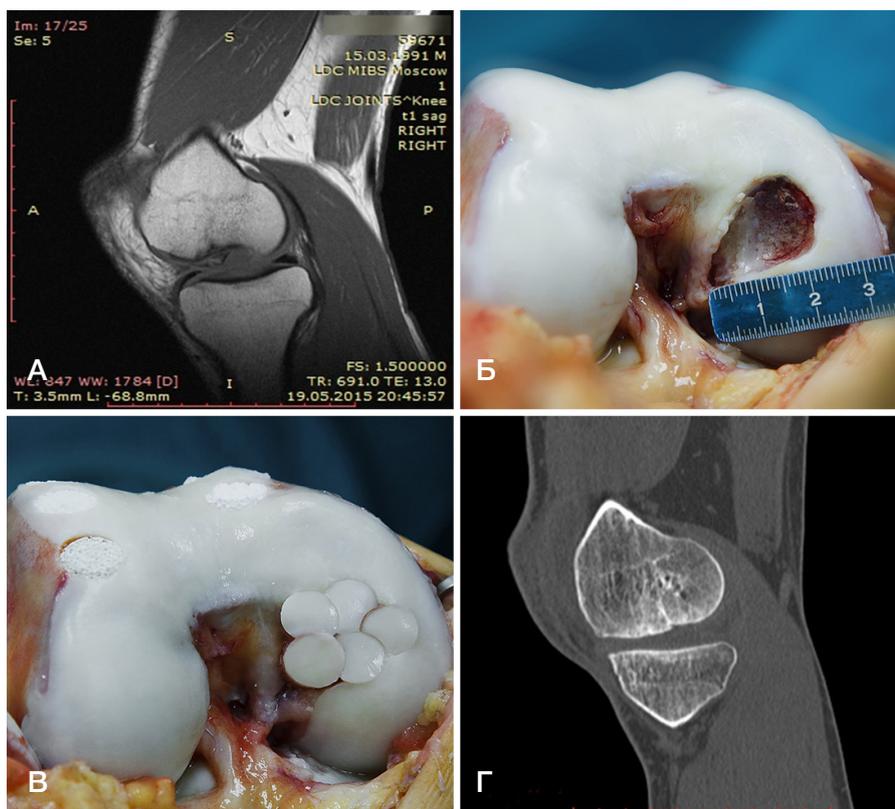


Рис. 2. А. МРТ-картина рассекающего остеохондрита медиального мыщелка бедренной кости. Б. Форма и размеры дефекта мыщелка после его санации. В. Результат «мозаичной» костно-хрящевой аутопластики. Донорские отверстия заполнены биокомпозитной костью. Г. МСКТ картина через 12 месяцев после операции. Отмечаются хорошая костная и хрящевая регенерация в зоне «мозаичной» пластики

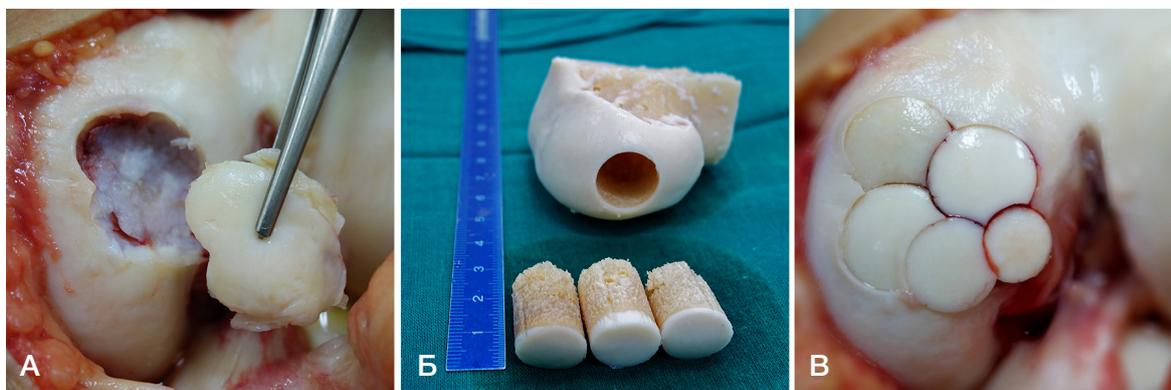


Рис. 3. А. Костно-хрящевой дефект медиального мыщелка бедренной кости (болезнь Кёнига). Б. Аллогенный лиофилизированный мыщелок бедренной кости и цилиндрические донорские столбики трансплантаты. В. Результат «мозаичной» костно-хрящевой аллопластики

На сегодняшний день для восстановления хрящевой ткани коллагеновая матрица является ведущим биологическим материалом, положительно влияющим на дифференцировку стволовых клеток и хондрогенез.

Операцию считаем показанной при полнослойных дефектах гиалинового хряща, без поражения субхондральной кости (3-я стадия по классификации ICRS). Обязательные условия для проведения — наличие здорового гиалинового хряща, окружающего дефект, жизнеспособной субхондральной кости и неизменной механической оси нижней конечности.

Противопоказаниями к операции считаем наличие множественных хрящевых дефектов, в том числе «целующихся повреждений»; распространенный остеоартроз коленного сустава; системные аутоиммунные заболевания; обусловленную повреждениями связок и менисков нестабильность коленного сустава; вальгусную или варусную деформацию голени, требующую выполнения корригирующих операций; аллергические реакции на коллаген.

Особенно пристальное внимание следует уделять состоянию субхондральной кости, выраженный склероз которой указывает на ее нежизнеспособность. Считаем необходимым выполнение санации нежизнеспособной кости до здоровых кровоточащих слоев с костной пластикой дефекта. Отсутствие «кровяной росы» после выполнения туннелизации субхондральной кости свидетельствует о нежизнеспособности, что должно насторожить хирурга. В таких случаях имплантация коллагеновой матрицы без костной пластики бесперспективна.

Представим несколько наших рекомендаций, сделанных на основании анализа отдаленных исходов применения

технологии индуцированного на матрице аутохондрогенеза у наших пациентов:

- имплантация коллагеновой матрицы показана только при здоровой и стабильной субхондральной кости;
- при глубоких (более 5 мм) локальных поражениях субхондральной кости показана костная пластика костно-хрящевого дефекта;
- одномоментная пластика костно-хрящевого дефекта биокompозитной костью и имплантация матрицы бесперспективны;
- при предоперационном планировании необходимо учитывать уровень физической активности пациентов. К сожалению, технология индуцированного на матрице аутохондрогенеза и спорт высших достижений несовместимы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов лечения пациентов, оперированных в нашей клинике, доступных материалов, данных литературы и технических возможностей позволил нам оптимизировать алгоритм хирургического лечения пациентов с рассекающим остеохондритом коленного сустава и сделать определенные выводы: 1) у пациентов с незакрытой зоной роста показано удаление нежизнеспособной хрящевой пластины, санация костно-хрящевого дефекта и туннелизация субхондральной кости; 2) при полнослойных локальных дефектах хряща без поражения субхондральной кости оптимальна технология индуцированного на матрице аутохондрогенеза; 3) при локальных остеохондральных дефектах площадью менее 10 см² методом выбора может быть «мозаичная» костно-хрящевая аутоотрансплантация; 4) при локальных костно-

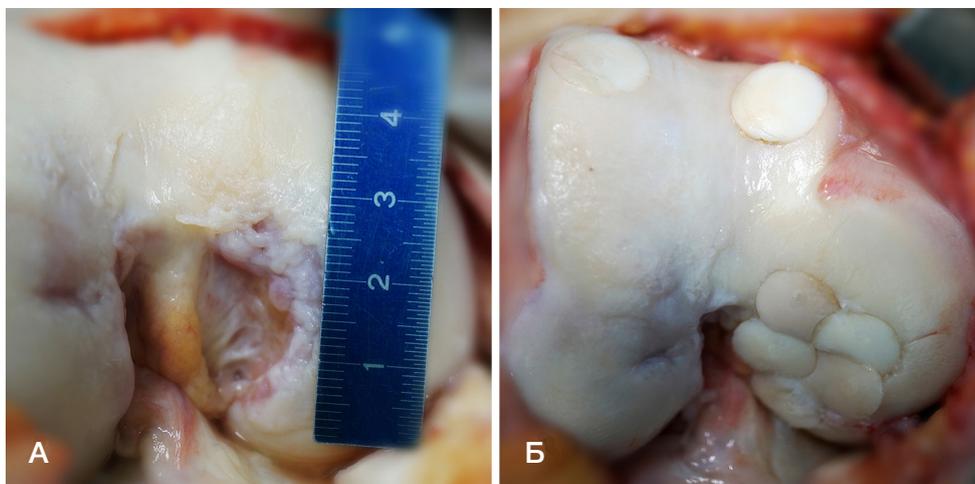


Рис. 4. А. Форма и размеры костно-хрящевого дефекта медиального мыщелка бедра при болезни Кёнига. Б. Результат комбинированной костно-хрящевой трансплантации. А — ауто, Д — донор алло

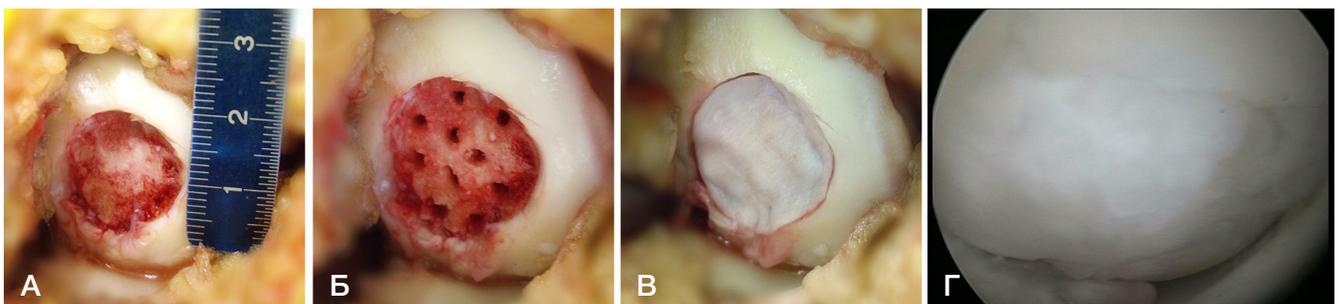


Рис. 5. А. Форма и размеры дефекта хряща медиального мыщелка бедра после его санации. Б. Субхондральная кость после туннелизации. В. Имплантация коллагеновой матрицы. Г. Артроскопическая картина через 1,4 года: дефект мыщелка полностью закрыт стабильной хрящевой тканью

- Sumanant C. Arthroscopic debridement for knee osteoarthritis (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2008; Issue 1. Art. No.: CD005118. DOI: 10.1002/14651858.CD005118.pub2.
7. Stadnikov AA, Kavalerskiy GM, Arhipov SV, Pavlov VP, Makarov SA, Makarov MA, i dr. Novye metody hirurgicheskogo lecheniya defectov gialinovogo chryasha kolennogo sustava u bol'nyh s gonartrozom. *Nauchno-practicheskaya revmatologiya*. 2009; 3: 90–3.
 8. Tratting S, Ba-Ssalamah A, Pinker K, Plank C, Vescei V, Marlovits S. *Magnetic Resonance Imaging*. 2005; 23 (7): 779–87.
 9. Koval'chul VN. Klassifikaciya povregdeniy chryasha kolennogo sustava. *Luchevaya diagnostica, luchevaya terapiya*. 2012; 1: 99–106.
 10. Golovaha ML, Loskutov AE, Egorov VF. Korrelyaciya dannyh magnitno-rezonansnoy tomografii i artroskopii pri travmaticheskikh povregdeniyah kolennogo sustava. *Praktikushemu vrachu*. 2011; 12 (2): 99–105.
 11. Lazishvili GD, Zatikyan VR, Shukyur-Zadeh ER, Kornaev AS, Akmatalliev KI, Danilov MA. Actual direction of chondroplasty. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2013; 3: 13–17.
 12. Malyshev EE, Korolyov SB, Pavlov DV, Kuvshinov SG. Osteochondral autoplasty of the extensive post-traumatic defect of the proximal tibia. *Modern technologies in medicine*. 2014; 6 (2): 142–7.
 13. Kotel'nikov GP, Larcev YV, Kudashev DS, Zuev-Ratnikov SD, Shorin IS. Mosaicplasty in the treatment of patients with destructive-dystrophic and post-traumatic lesions hyaline cartilage in the knee joint — experimental and clinical aspects. *Fundamental research*. 2013; 9: 252–5.
 14. Zakirova AR. *Artroskopicheskoe lechenie hrjashyevyh defectov kolennogo sustava*. M.: 2010.
 15. Caldwell PE, Shelton WR. Indications for allografts. *Orthop Clin North Am*. 2005; 36 (4): 459–67.
 16. Sadlik B, Wiewiorski M. Implantation of a collagen matrix for an AMIC repair during dry arthroscopy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015; 23: 2349–52.
 17. Gille J, Schuseil E, Wimmer J, et al. Mid-term results of autologus matrix-induced chondrogenesis for treatment of focal cartilage defects in the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010; 18: 1456. <https://doi.org/10.1007/s00167-010-1042-3>.
 18. Pascarella A, Ciatti R, Pascarella F, et al. Treatment of articular cartilage lesions of the knee joint using a modified AMIC technique. *Knee Surg Sports Traumatol. Arthrosc*. 2010; 18: 509–13.
 19. Anders S, Wiech O, Schaumburger J, et al. Autologus Matrix induced chondrogenesis (AMIC) for focal chondal defects of the knee – first results. *J Bone Jt Surg (Brit.)*. 2009; 91 (suppl.1): 83–4.
 20. Hangody L, Vasarhelyi G, Hangody LR, et al. Autologus osteochondral grafting technique and long-term results. *Injury*. 2008; 39 (suppl.1): 32–9.
 21. Steinwachs M, Kreuz PC. Autologus chondrocyte implantation in chondral defects of the knee with a type I/III collagen membrane: A prospective study with a 3-year follow-up. *Arthroscopy*. 2007; 23: 381–7.
 22. Garkavi AV, Blokov MY. *Artroskopicheskaya chondroplastika lokal'nykh chryashevyyh defectov kolennogo sustava s ispol'zovaniem kollagenovoy membrany CHONDRO-GIDE*. Kafedra travmatologii i ortopedii. 2015; 3 (15): 4–7.
 23. Jacob RP. AMIC technique for cartilage repair, a single-step surgical intervention as compared to other methods. *Eur Cell Mater*. 2006; 12 (suppl.1): 26–32.
 24. Kramer J, Bohrsen F, Lindner U, et al. In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63 (5): 616–26.