

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Денис Ребриков, д. б. н., профессор

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

РЕДАКТОРЫ Валентина Гейдебрехт, Надежда Тихомирова

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР Евгений Лукьянов

ПЕРЕВОДЧИКИ Наталия Усман

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марины Дорониной

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Аверин, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
Н. Н. Алипов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Р. Богомилский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. К. Божено, 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)
Г. Е. Гендлин, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)
Л. Р. Горбачева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
И. Г. Гордеев, д. м. н., профессор (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)
Т. В. Зарубина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Е. Каган, профессор (Питтсбург, США)
Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)
Б. А. Кобринский, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Козлов, MD PhD (Вена, Австрия)
Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)
М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)
Н. Е. Мантурова, д. м. н. (Москва, Россия)
О. Ю. Милушкина, д. м. н., доцент (Москва, Россия)
З. Б. Митупов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
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)
Ю. П. Пивоваров, д. м. н., академик РАН, профессор (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)
А. Ю. Разумовский, член-корр., профессор (Москва, Россия)
О. Ю. Реброва, д. м. н. (Москва, Россия)
А. С. Рудой, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
А. К. Рылова, 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)
Н. А. Скоблина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. М. Смирнов, д. б. 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, академик 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. (Новосибирск, Россия)
Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)
М. А. Чундокова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Л. Н. Шишкина, д. б. н. (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 включен в Scopus. CiteScore 2021: 0,5

Журнал включен в WoS. JCR 2021: 0,5

Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 8

Scopus®

WEB OF SCIENCE™

Google
scholar

Scimago Journal & Country Rank 2020: 0,14

Журнал включен в Перечень 31.01.2020 (№ 507)

Здесь находится открытый архив журнала

SJR
Scimago Journal & Country Rank

ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2022-03

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 30.06.2022
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии PrintFormula
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, professor

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc, professor

EDITORS Valentina Geidebrekht, Nadezda Tikhomirova

TECHNICAL EDITOR Evgeny Lukyanov

TRANSLATORS Natalia Usman

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

Averin VI, DSc, professor (Minsk, Belarus)
Alipov NN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)
Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)
Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)
Gendlin GYe, DSc, professor (Moscow, Russia)
Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)
Gorbacheva LR, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gordeev IG, DSc, professor (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)
Zarubina TV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Kagan VE, professor (Pittsburgh, USA)
Kzyzhkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)
Kobriniskii BA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Kozlov AV, MD PhD, (Vienna, Austria)
Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)
Lebedev MA, PhD (Darem, USA)
Manturova NE, DSc (Moscow, Russia)
Milushkina OYu, DSc, professor (Moscow, Russia)
Mitupov ZB, DSc, professor (Moscow, Russia)
Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)
Pivovarov YuP, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Razumovskii AYU, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Rebrova OYu, DSc (Moscow, Russia)
Rudoy AS, DSc, professor (Minsk, Belarus)
Rylova AK, DSc, professor (Moscow, Russia)
Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Skoblina NA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Smirnov VM, 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)
Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Takhchidi KhP, member of RAS, 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)
Chundukova MA, DSc, professor (Moscow, Russia)
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. CiteScore 2021: 0.5

Scopus

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0.14

SJR
Scimago Journal & Country Rank

Indexed in WoS. JCR 2021: 0.5

WEB OF SCIENCE

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 507)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Five-year h-index is 8

Google
scholar

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2022-03

The mass media registration certificate № 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 30.06.2022
Circulation: 100 copies. Printed by PrintFormula
www.print-formula.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

5

Белок InlB, секретируемый *Listeria monocytogenes*, контролирует взаимодействие возбудителя с макрофагами
Я. М. Чаленко, М. М. Абдулкадиева, П. В. Сафарова, Е. В. Калинин, Д. А. Слонова, С. А. Ермолаева

InlB protein secreted by *Listeria monocytogenes* controls the pathogen interaction with macrophages
Chalenko YM, Abdulkadiyeva MM, Safarova PV, Kalinin EV, Slonova DA, Ermolaeva SA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

11

Сравнительный анализ эффективности общедоступных методов трансфекции модельных клеточных линий для задач биотехнологии
П. О. Воробьев, Д. В. Кочетков, К. В. Василенко, А. В. Липатова

Comparative efficiency of accessible transfection methods in model cell lines for biotechnological applications
Vorobyev PO, Kochetkov DV, Vasilenko KV, Lipatova AV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

20

Изоформы микроРНК miR-148a и miR-203a предположительно играют роль супрессоров колоректального рака
С. А. Нерсисян

Isoforms of miR-148a and miR-203a are putative suppressors of colorectal cancer
Nersisyan SA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

27

Влияние субингибирующих концентраций G4-стабилизирующих лигандов на транскриптомный профиль *Mycobacterium smegmatis*
М. В. Зайчикова, Д. А. Беспятых, М. В. Малахова, И. Н. Бодоев, Т. С. Ведехина, В. А. Веселовский, К. М. Климина, А. М. Варижук, Е. А. Шитиков

Transcriptional profiling of *Mycobacterium smegmatis* exposed to subinhibitory concentrations of G4-stabilizing ligands
Zaychikova MV, Bespiatykh DA, Malakhova MV, Bodoev IN, Vedekhina TS, Veselovsky VA, Klimina KM, Varizhuk AV, Shitikov EA

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

36

Роль генетических факторов при семейном случае акне
О. М. Демина, А. Г. Румянцев, Н. Н. Потекаев

The role of genetic factors in familial case of acne
Demina OM, Rumyantsev AG, Potekaev NN

МНЕНИЕ

40

Межмембранная олигомеризация М-белка коронавируса SARS-CoV-2: возможная роль в почковании вируса
Е. Л. Соколинская, Л. В. Путляева, А. А. Горшкова, К. А. Лукьянов

Intermembrane oligomerization of SARS-CoV-2 M-protein: possible role in viral budding
Sokolinskaya EL, Putlyayeva LV, Gorshkova AA, Lukyanov KA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

44

Новая стратегия поиска гормональной терапии пролиферативных процессов эндометрия у пациенток в постменопаузе
Г. М. Савельева, В. Г. Бреусенко, Е. Н. Карева, Г. Н. Голухов, Д. С. Гуторова, А. В. Овчинникова, Т. Н. Ивановская, К. В. Щербатюк

A new strategy in selection of hormone therapy for endometrial proliferative process in postmenopausal patients
Savelyeva GM, Breusenko VG, Kareva EN, Golukhov GN, Gutorova DS, Ovchinnikova AV, Ivanovskaya TN, Shcherbatyuk KV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

53

Изменение аминокислотного профиля в системе «мать-плод» при COVID-19

Н. А. Ломова, В. В. Чаговец, Е. Л. Долгополова, А. В. Новоселова, У. Л. Петрова, Р. Г. Шмаков, В. Е. Франкевич

Altered amino acid profiles of the “mother-fetus” system in COVID-19

Lomova NA, Chagovets VV, Dolgopolova EL, Novoselova AV, Petrova UL, Shmakov RG, Frankevich VE

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

64

Прогнозирование преждевременных родов на основании исследования микробиоты влагалища методом ПЦР в реальном времени в первом триместре беременности

Е. С. Ворошилина, Л. В. Хаютин, Е. В. Кудрявцева, В. В. Ковалев, Е. Э. Плотко

Predicting preterm birth based on vaginal microbiota assessment by real-time PCR in the first trimester

Voroshilina ES, Khautin LV, Kudryavtseva EV, Kovalev VV, Plotko EE

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

70

Клинико-морфологические особенности немелкоклеточного рака легкого у больных с разными вариантами гистологических изменений бронхиального эпителия

М. В. Завьялова, Д. М. Лоос, Д. С. Письменный, А. А. Дурова, О. В. Панкова, Е. О. Родионов, С. А. Тузиков, Л. А. Таширева, В. М. Перельмутер

Clinical and morphological features of non-small cell lung cancer in patients with different types of histological changes to the bronchial epithelium

Zavyalova MV, Loos DM, Pismenny DS, Durova AA, Pankova OV, Rodionov EO, Tuzikov SA, Tashireva LA, Perelmutter VM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

78

Изучение эффектов вариативности потенциалов мозга человека в интерфейсе мозг–компьютер на волне P300

И. П. Ганин, А. Я. Каплан

Study of the human brain potentials variability effects in P300 based brain–computer interface

Ganin IP, Kaplan AY

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

86

Оценка частоты глазных изменений и качества жизни пациентов при хронических миелопролиферативных заболеваниях

Э. М. Юнусова, Т. Р. Мухамадеев, Б. А. Бакиров

Assessment of ocular manifestation frequency and quality of life in chronic myeloproliferative disorders

Yunusova EM, Mukhamadeev TR, Bakirov BA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

91

Выраженность когнитивных и неврологических нарушений у крыс после ишемического инсульта на фоне применения ксенона 0,5 МАК

И. А. Крюков, А. В. Ершов, Р. А. Черпаков, О. А. Гребенчиков

Alleviation of neurological and cognitive impairments in rat model of ischemic stroke by 0.5 MAC xenon exposure

Krukov IA, Ershov AV, Cherpakov RA, Grebenchikov OA

БЕЛОК INLB, СЕКРЕТИРУЕМЫЙ *LISTERIA MONOCYTOGENES*, КОНТРОЛИРУЕТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ С МАКРОФАГАМИ

Я. М. Чаленко¹✉, М. М. Абдулкадиева², П. В. Сафарова^{1,3}, Е. В. Калинин¹, Д. А. Слонова⁴, С. А. Ермолаева¹

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

² Объединенный институт высоких температур, Москва, Россия

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

⁴ Автономная некоммерческая образовательная организация высшего профессионального образования «Сколковский институт науки и технологий», Москва, Россия

Способность инфицировать и размножаться в непрофессиональных фагоцитах лежит в основе вирулентности грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes*. В процессе протекания инфекции захваченные клетками системы мононуклеарных фагоцитов листерии устойчивы к перевариванию и могут размножаться внутри макрофагов. Один из ключевых факторов патогенности *L. monocytogenes* белок интерналин В (InlB) взаимодействует с рецепторами клеток млекопитающих c-Met и gC1qR. При его взаимодействии с рецепторами, находящимися на поверхности эпителиальных клеток, происходит активация рецепторов, перестройки цитоскелета и, как результат, активная инвазия бактерий внутрь непрофессиональных фагоцитов. На сегодняшний день ничего неизвестно о влиянии InlB на взаимодействие *L. monocytogenes* с макрофагами, в то время как оба таргетных рецептора экспрессируются на поверхности макрофагов и вовлечены в развитие иммунных реакций. Целью работы было определить потенциальное влияние InlB на взаимодействие *L. monocytogenes* с макрофагами. Установлено, что 1) наличие InlB в 3,5 раза достоверно улучшает поглощение *L. monocytogenes* макрофагами; 2) через 24 ч штаммы EGDeΔinlB, EGDe и EGDeΔinlB::pInlB увеличили свою численность внутри макрофагов в $182,5 \pm 16,7$, 96 ± 12 и $13,3 \pm 3$ раз соответственно; 3) Штамм EGDeΔinlB::pInlB, комплементированный плазмидной копией гена *inlB*, продуцировал InlB в 3,3 раза лучше, чем штамм EGDe. Таким образом мы предполагаем, что InlB влияет на выживаемость листерий внутри макрофагов. Полученные результаты углубляют понимание процессов взаимодействия возбудителя с макрофагами.

Ключевые слова: листериоз, *Listeria monocytogenes*, интерналин В, врожденный иммунитет, макрофаги человека

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-00105).

Вклад авторов: Я. М. Чаленко — планирование исследования, подготовка и непосредственное участие во всех экспериментах, интерпретация данных и написание статьи; М. М. Абдулкадиева, П. В. Сафарова — проведение экспериментов по инфицированию макрофагов; Е. В. Калинин — анализ экспрессии InlB; Д. А. Слонова — выделение и дифференцировка макрофагов, С. А. Ермолаева — планирование исследования и написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи (протокол № 3 от 26 февраля 2018 г.). Исследование проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской организации.

✉ **Для корреспонденции:** Ярослава Михайловна Чаленко
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098, Россия; yaraslavazaka@yandex.ru

Статья получена: 11.05.2022 **Статья принята к печати:** 03.06.2022 **Опубликована онлайн:** 24.06.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.034

INLB PROTEIN SECRETED BY *LISTERIA MONOCYTOGENES* CONTROLS THE PATHOGEN INTERACTION WITH MACROPHAGES

Chalenko YM¹✉, Abdulkadieva MM², Safarova PV^{1,3}, Kalinin EV¹, Slonova DA⁴, Ermolaeva SA¹

¹ Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

² Joint Institute for High Temperatures, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

The virulence of gram-positive bacterium *Listeria monocytogenes* depends on its capacity to infect non-professional phagocytes and proliferate inside them. *Listeria monocytogenes* captured by mononuclear phagocytic cells during the infectious process are resistant to lysosomal digestion and can proliferate inside macrophages. Internalin B (InlB), one of the key pathogenicity factors of *L. monocytogenes*, interacts with mammalian receptors c-Met and gC1q-R. For epithelial cells, such interactions with surface receptors promote activation of these receptors and cytoskeletal remodeling, which leads to massive bacterial invasion into non-professional phagocytes. For macrophages, by contrast, nothing is known about the role of InlB in their interactions with *L. monocytogenes* apart from the fact that both receptors are abundantly expressed by macrophages and participate in the development of immune reactions. This study aimed at determination of the potential role of InlB in the interactions between *L. monocytogenes* and macrophages. We found that 1) InlB expression promoted a significant 3.5-fold increase in the rates of *L. monocytogenes* capture by macrophages; 2) the 24 h fold increase in bacterial number inside macrophages constituted 182.5 ± 16.7 , 96 ± 12 and 13.3 ± 3 for EGDeΔinlB, EGDe and EGDeΔinlB::pInlB strains, respectively; 3) the EGDeΔinlB::pInlB strain, complemented with a plasmid copy of *inlB*, produced InlB at 3.3-fold higher rates than the type strain EGDe. We conclude that InlB negatively affects the survival of listeria inside macrophages. The results enable advanced understanding of the host-pathogen interactions for *L. monocytogenes*.

Keywords: listeriosis, *Listeria monocytogenes*, internalin B, innate immunity, human macrophages

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (project number 21-74-00105).

Author contribution: Chalenko YM — research planning, preparation and direct participation in all experiments, data interpretation and manuscript writing; Abdulkadieva MM, Safarova PV — macrophage infection assay; Kalinin EV — InlB expression analysis; Slonova DA — macrophage isolation and differentiation assay; Ermolaeva SA — research planning and manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the research was conducted in compliance with the ethical principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Yaroslava M. Chalenko
Gamaleya, 18, Moscow, 123098, Russia; yaraslavazaka@yandex.ru

Received: 11.05.2022 **Accepted:** 03.06.2022 **Published online:** 24.06.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.034

Самые ранние сведения о существовании *Listeria monocytogenes* относятся к 1926 г., когда была описана летальная инфекция у кроликов, у которых развивался выраженный моноцитоз [1]. Грамположительная бактерия *L. monocytogenes* вызывает листериоз — тяжелое системное заболевание животных и человека [2]. У людей основными клиническими признаками листериоза являются сепсис, менингит и менингоэнцефалит [3]. Иммунологическая защита от *L. monocytogenes* обусловлена в основном системой врожденного и адаптивного клеточного иммунитета. Первыми эффекторными клетками являются макрофаги. *L. monocytogenes* относится к факультативным внутриклеточным бактериям, фагоцитируется клетками системы мононуклеарных фагоцитов и может размножаться внутри них.

Критическим этапом инфекционного процесса является инвазия *L. monocytogenes* в непрофессиональные фагоциты. Для этого *L. monocytogenes* имеет на клеточной поверхности белки интерналин А (InlA) и интерналин В (InlB). InlA ковалентно связан с бактериальной поверхностью и его взаимодействие с целевым рецептором Е-кадгеринном опосредует ремоделирование цитоскелета и бактериальную интернализацию [4]. InlB присутствует в двух формах: одна из них связана с бактериальной поверхностью и опосредует активную инвазию бактерий внутрь клеток непрофессиональных фагоцитов; роль второй формы (растворимой) может заключаться в неспецифичной активации сигнальных путей при связывании с целевыми рецепторами, и ее функциональное значение до конца не изучено. c-Met и gC1q-R — эукариотические рецепторы InlB [5–6]. c-Met — это рецептор для фактора роста гепатоцитов. Его активация приводит к запуску сигнальных путей, опосредующих пролиферацию и миграцию клеток, а также контролирующую иммунный ответ в некоторых типах клеток [7]. c-Met экспрессируется во множестве эпителиальных клеток, а также в клетках иммунной системы: макрофагах, моноцитах, дендритных клетках и Т-клетках [8]. Известно также, что передача сигналов от c-Met смещает макрофаги М1-фенотипа в сторону М2-подобного фенотипа [9].

Второй таргетный рецептор InlB gC1q-R представляет собой повсеместно экспрессируемый белок, который первоначально идентифицировали как рецептор глобулярных головок C1q [10]. Позднее было установлено, что gC1q-R многофункционален и взаимодействует с широким спектром лигандов эндогенного и экзогенного происхождения [11]. Связывание InlB с gC1qR способствует проникновению листерий в клетки млекопитающих. Продemonстрировано, что взаимодействие InlB с c-Met и gC1qR существенно влияет на динамику фосфорилирования в сигнальных каскадах, контролируемых PI3-и MAPK-киназами в эпителиальных клетках человека, и описаны структурно-функциональные особенности взаимодействий между InlB и его таргетными рецепторами [12–14]. Как и рецептор c-Met, gC1qR активно экспрессируется на поверхности В-лимфоцитов и макрофагах [15].

Таким образом оба рецептора для InlB вовлечены во множество сигнальных путей, опосредующих иммунные реакции организма. Была высказана гипотеза, что InlB может быть вовлечен в регуляцию врожденного иммунного ответа макроорганизма за счет активации NF-κаррaВ и запуска PI3-киназного пути в макрофагах [16]. В пользу гипотезы свидетельствуют опубликованные факты о том, что взаимодействие c-Met с InlB способствует миграции некоторых типов иммунных клеток и

приводит к продукции перитонеальными дендритными клетками провоспалительного цитокина IL6 [17]. Однако экспериментальных данных о роли InlB во взаимодействии *L. monocytogenes* с макрофагами до настоящего времени опубликовано не было.

Целью данной работы было изучение роли InlB во взаимодействиях листерий с макрофагами человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение макрофагов человека из периферической крови

Макрофаги человека дифференцировали из моноцитов, выделенных из мононуклеарной фракции периферической крови. Кровь получали от здоровых доноров. Выделение моноцитов осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности с использованием Ficoll-Paque Premium (HyClone; США) и с последующей адгезией [18]. Моноциты инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 6 дней в среде RPMI-1640, содержащей 2%-ю инактивированную сыворотку крови человека, 2 mM L-глутамин, 10 mM HEPES, 50 мкM β-меркаптоэтанол, 2 mM пируват натрия и 2 mM витаминов MEM (HyClone; США). В первый день в среду добавляли 50 нг/мл GM-CSF (SciStore; Россия). Обновление среды проводили на 4-й день с добавлением 50 нг/мл GM-CSF. Клетки окрашивали конъюгированными с флуорофором первичными антителами против CD11b (APC-Cy7), CD80 (PE-Cy5), CD86 (BV421), HLA-DR (PE-Cy7) и анализировали с помощью проточного цитометра (Beckman Coulter; США).

Бактериальные штаммы и условия культивирования

В работе использовали следующие штаммы *L. monocytogenes*: типовой штамм EGDe, и штамм EGDeΔinlB (с хромосомной делецией гена *inlB*), а также штамм EGDeΔinlB::pInlB, содержащий плазмиду, несущую ген *inlB*, которая комплементировала делецию хромосомной копии гена. Штамм EGDeΔinlB был любезно предоставлен профессором J. Vazquez-Boland, Univ. Эдинбург, Великобритания. InlB-экспрессирующая плазида и штамм EGDeΔinlB::pInlB были описаны ранее [14]. Все штаммы *L. monocytogenes* культивировали на жидкой питательной среде BHI (Becton, Dickinson and Company; США) при 37 °C и постоянном встряхивании при 200 об./мин. Штаммы, несущие InlB-экспрессирующую плазмиду, выращивали в присутствии 10 мкг/мл эритромицина для поддержания плазмиды. Для получения заражающих культур бактерии выращивали до середины логорифмической фазы, трижды промывали PBS (Amresco; США), разделяли на аликвоты по 100 мкл и замораживали в присутствии 10% глицерина (Sigma-Aldrich; США).

Анализ эффективности захвата бактерий

Макрофаги выращивали в 24-луночных планшетах. Концентрацию бактериальных клеток в замороженной культуре определяли методом серийных разведений. К макрофагам в питательной среде вносили бактерии в соотношении 1 : 100 (MOI). Через 1 ч инкубации при 37 °C и 5% CO₂ клетки трижды промывали PBS, после добавляли среду DMEM (ПанЭко; Россия), содержащую гентамицин (Sigma-Aldrich; США) в концентрации 100 мкг/мл для уничтожения внеклеточных бактерий. После 1 ч

инкубации клетки тщательно промывали PBS для удаления гентамицина и лизировали 1% Triton X 100 (Sigma-Aldrich; США). Далее делали серийные разведения и высевали бактерии на твердую питательную среду BHI. Для комплементированных штаммов высевы делали на среду с добавлением эритромицина 10 мкг/мл. Эффективность захвата оценивали по соотношению количества захваченных бактерий к количеству добавленных бактерий.

Анализ выживаемости *L. monocytogenes* в макрофагах человека

Через 1 ч инкубации при 37 °C и 5% CO₂ клетки трижды промывали PBS, после добавляли среду DMEM (ПанЭко; Россия), содержащую гентамицин (Sigma-Aldrich; США) в концентрации 100 мкг/мл для уничтожения внеклеточных бактерий. Через 1 ч инкубации с высокой концентрацией гентамицина среду удаляли, клетки промывали, в лунки 24-луночных планшетов вносили DMEM (ПанЭко; Россия) с содержанием гентамицина (Sigma-Aldrich; США) 20 мкг/мл для препятствия выживанию листерий вне макрофагов. Планшеты инкубировали 24 ч (от начала инфекции) при 37 °C и 5% CO₂. Далее клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) для удаления гентамицина и макрофаги лизировали добавлением 100 мкл 1% Triton X 100. Лизат доводили до 1 мл добавлением 900 мкл PBS. Далее делали серийные разведения и высевали бактерии на твердую питательную среду BHI. Для комплементированного штамма высевы делали на среду с добавлением эритромицина 10 мкг/мл. Эффективность выживания оценивали по соотношению количества выживших бактерий на количество захваченных бактерий.

ИФА-тест система для определения уровня экспрессии InlB

Штаммы *L. monocytogenes* были выращены в BHI в течение 18 ч. Супернатант и клетки отделяли центрифугированием (4200 об/мин, 15 мин). Клетки были отмыты трижды PBS и

ресуспендированы в 500 мкл карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6). Для проведения анализа уровня InlB на клеточной поверхности мы использовали прямой метод. В лунки 96-луночного планшета добавляли 100 мкл образца. Инкубировали ночь при + 4 °C. Затем отмывали TTBS трижды по 250 мкл. Далее к образцам добавляли по 200 мкл блокирующий буфер и инкубировали 1 ч при комнатной температуре (NT). Конъюгированные с HRP антитела к InlB добавляли к образцам в разведение 1 : 4000 по 100 мкл на лунку и инкубировали в течение 1 ч при NT. Затем отмывали 6 раз по 250 мкл TTBS. Для визуализации добавляли по 100 мкл TMB (ThermoFischer scientific; США). Реакцию останавливали внесением в каждую лунку по 100 мкл 2 M H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм на планшетном фотометре iMark (Bio-Rad; США). Для проведения анализа уровня секретируемого InlB использовали «Сэндвич»-метод. В лунки 96-луночного планшета добавляли 100 мкл антител против InlB (4 мкг/мл), разведенных в карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6), и инкубировали ночь при + 4 °C. Затем промывали TTBS 3 раза по 250 мкл. Далее в лунки вносили по 200 мкл блокирующего буфера (2% BSA) и инкубировали 1 ч при RT. Затем удаляли блокирующий буфер и добавляли 100 мкл образца и инкубировали 1 ч при RT. После отмывали 3 раза TTBS по 250 мкл. Конъюгированные с HRP антитела к InlB в разведение 1 : 4000 добавляли в объеме 100 мкл на лунку и инкубировали 1 ч. Отмывали 6 раз по 250 мкл TTBS. Проявляли TMB-субстратом 100 мкл. Для остановки реакции использовали 100 мкл серной кислоты (2 M). Измерение оптической плотности проводили при длине волны 450 нм на планшетном фотометре iMark (Bio-Rad; США). Концентрацию InlB определяли по калибровочной кривой и пересчитывали на число клеток в образце.

Статистический анализ

Все эксперименты проводили в трех повторениях и не менее четырех раз. Для статистического анализа использовали односторонний ANOVA с post hoc-Tukey

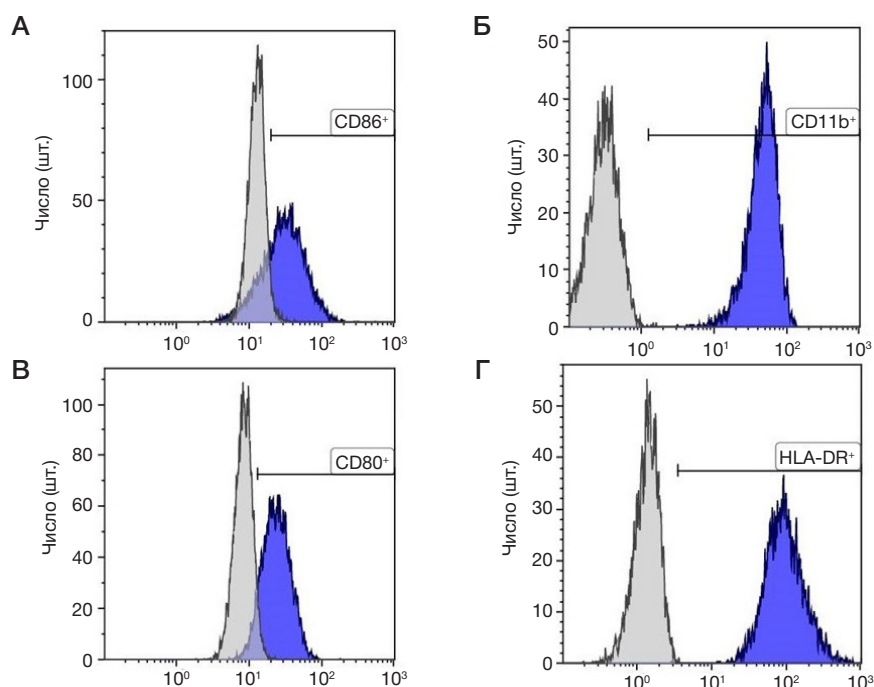


Рис. 1. Проточная цитометрия макрофагов, полученных из моноцитов крови здоровых доноров. Макрофаги были дифференцированы до M1-фенотипа. А. Экспрессия маркера CD86. Б. Экспрессия маркера CD11b. В. Экспрессия маркера CD80. Г. Экспрессия маркера HLA-DR

(<https://www.socscistatistics.com/tests/anova/default2.aspx>). Значение $p < 0,05$ считали показателем статистически значимой разницы (см. Приложение 1 и 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика дифференцированных макрофагов

Макрофаги играют важную роль во врожденном иммунном ответе и в стимулировании дифференцировки иммунных эффекторных клеток; в целом ответ первых инфицированных клеток в организме хозяина формирует последующий врожденный и адаптивный иммунитет к *L. monocytogenes*. Макрофаги были проанализированы с использованием проточной цитометрии. Фенотип клеток, полученных из моноцитов, характеризовался наличием на поверхности CD11b, CD80, CD86 и HLA-DR — маркеров, экспрессируемых на провоспалительных макрофагах M1-типа [19] (рис. 1). Клетки содержали крупное округлое ядро с гетерохроматином, локализованным под ядерной мембраной, и имели множество отростков на поверхности. Клетки были прочно адгезированы к поверхности лунок (рис. 2).

Фагоцитоз *L. monocytogenes* макрофагами зависит от наличия *InlB*

Взаимодействие с-Met непрофессиональных фагоцитов с *InlB*, который связан с бактериальной поверхностью, опосредует перестройки цитоскелета эукариотической клетки, приводит к формированию фагосомной чаши с последующей интернализацией бактерий внутрь клеток. Однако значение *InlB* для взаимодействия с профессиональными фагоцитами остается неизвестным. В первом эксперименте мы проанализировали, влияет ли наличие *InlB* на эффективность захвата макрофагами *L. monocytogenes*. Для этого мы добавили к макрофагам M1-типа три штамма *L. monocytogenes*: типовой штамм EGDe, штамм EGDe Δ *inlB* (Δ *InlB*) — лишенный гена *inlB* и полученный на основе штамма EGDe, и штамм EGDe Δ *inlB*::*pInlB* (*InlB*) — содержащий плазмиду, несущую ген *inlB*. Полученные данные показали, что наличие *InlB* в 3,5 раза достоверно улучшает поглощение *L. monocytogenes* макрофагами (рис. 3). Достоверных различий между штаммами дикого типа EGDe и EGDe Δ *inlB*::*pInlB* выявлено не было (см. Приложение 1).

Выживаемость *L. monocytogenes* в макрофагах зависит от наличия *InlB*

Через 24 ч мы оценили, влияет ли наличие *InlB* на выживаемость листерий внутри макрофагов человека. Мы обнаружили, что через это время штамм, лишенный *InlB*, увеличил численность внутри макрофагов в $182,5 \pm 16,7$ раз, типовой штамм EGDe размножился менее эффективно и увеличил свою численность в 96 ± 12 раз. Удивительно, что штамм EGDe Δ *inlB*::*pInlB*, комплементированный плазмидной копией гена *inlB*, размножился хуже всего и увеличил свою численность только в $13,3 \pm 3$ раз (рис. 4) (см. Приложение 2). Такой эффект мог быть связан с тем, что штамм комплементирован на основе плазмиды и экспрессия плазмиды может потреблять дополнительные клеточные ресурсы. Для подтверждения возможности данного факта мы провели инфицирование клеток линии HEp-2, аналогично анализу захвата макрофагами,

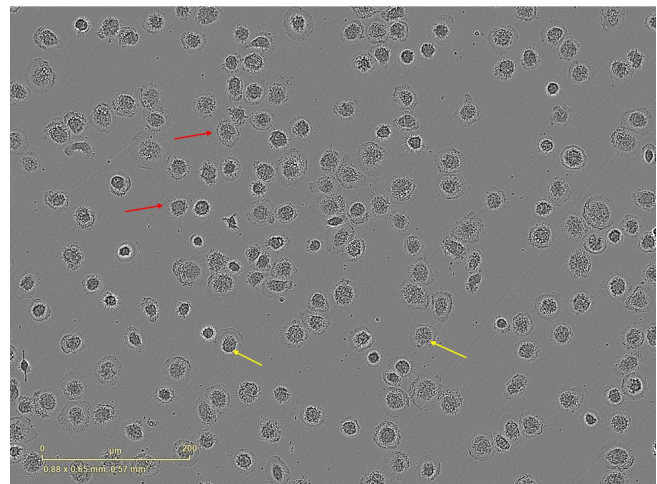


Рис. 2. Морфология клеток, полученных из моноцитов крови здоровых доноров. Красные стрелки указывают на выросты клеточной поверхности, желтые — на крупное округлое ядро. Фотографии были получены с помощью прибора IncuCyte® S3 Live-Cell Imaging System (Sartorius; Göttingen, Germany)

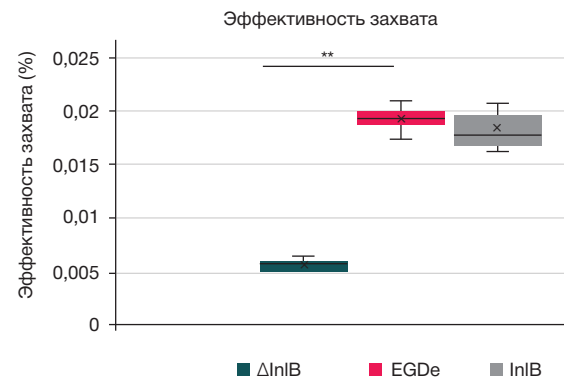


Рис. 3. Гистограмма, отражающая эффективность захвата макрофагами человека M1-типа *L. monocytogenes*, в зависимости от наличия *InlB*. Штамм Δ *InlB* — нокаутный по гену *inlB*, EGDe — типовой штамм, *InlB* — штамм, комплементированный по гену *inlB*; ** — $p < 0,01$ ($n = 4$)

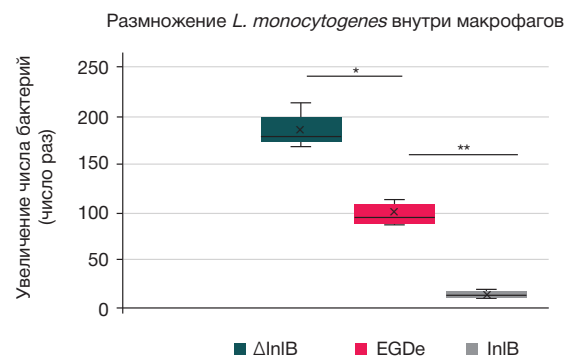


Рис. 4. Выживаемость *L. monocytogenes* в макрофагах M1-типа через 24 ч от начала инфекции. Штамм Δ *InlB* — нокаутный по гену *inlB*, EGDe — типовой штамм, *InlB* — штамм, комплементированный по гену *inlB*; * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ ($n = 4$)

штаммами EGDe и EGDe Δ *inlB*::*pInlB*. Через 24 ч штамм EGDe увеличил свою численность в 515,78 раз, а штамм EGDe Δ *inlB*::*pInlB* увеличил свою численность в 508,9 раз ($n = 3$). Таким образом размножение штамма «дикого типа» и штамма, несущего дополнительную плазмиду, было сопоставимым в клетках линии HEp-2.

Учитывая, что наличие *InlB* снижает выживаемость типового штамма EGDe по сравнению со штаммом, лишенным гена *inlB*, мы предположили, что наблюдаемый эффект сниженной выживаемости комплементированного штамма может быть связан с уровнем продукции *InlB*.

Для определения уровня продукции между штаммами мы использовали ИФА-тест систему, чтобы оценить количество InlB на бактериальной поверхности и в окружающей среде. Мы обнаружили, что на клеточной поверхности количество InlB было сопоставимо между штаммами EGDe и EGDe Δ InlB::pInlB. Однако в супернатанте уровень InlB для EGDe Δ InlB::pInlB был в 3,3 раза выше, чем для типового штамма EGDe (рис. 5). Таким образом наблюдаемые результаты свидетельствуют в пользу нашего предположения, что выживаемость и/или размножение *L. monocytogenes* в макрофагах человека зависит от количества InlB.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы показали, что взаимодействие *L. monocytogenes* с макрофагами зависит от экспрессии бактериями фактора патогенности белка InlB: наличие InlB на бактериальной поверхности усиливает захват бактерий макрофагами, а также существенно снижает выживаемость листерий внутри макрофагов. Более того, чем выше уровень продукции InlB, тем хуже выживаемость *L. monocytogenes* внутри макрофагов.

Анализируя литературные данные, мы обнаружили исследование, где сравнивали различия в уровне экспрессии гена inlB между клиническими и неклиническими изолятами и продемонстрировали, что уровень продукции InlB достоверно ниже у клинических изолятов [20]. При этом чем ниже уровень продукции InlB, тем ниже был уровень IL8 вырабатываемого непрофессиональными фагоцитами [20]. Авторы предположили, что более низкая способность клинических штаммов индуцировать IL8, возможно, является механизмом уклонения от иммунитета, хотя это приводит к уменьшению эффективности инвазии в клетки непрофессиональных фагоцитов [20]. Результаты нашего исследования, демонстрирующие, что высокие уровни продукции InlB негативно сказываются на выживаемости листерий внутри макрофагов человека, подтверждают эти наблюдения.

Из двух таргетных рецепторов InlB выбрать рецептор, ответственный за наблюдаемый эффект, пока не представляется возможным. Известно, что активация с-Met его физиологическим лигандом — фактором роста гепатоцитов (HGF) — приводит к изменению фенотипа макрофагов с M1 на M2 [9]. Взаимодействие InlB с с-Met имитирует активность HGF, что приводит к активации NF- κ B и запуску PI3-киназного и MAPK-киназного путей, в том числе в макрофагах [14, 16]. Известно, что взаимодействие с-Met с InlB может способствовать миграции некоторых типов иммунных клеток. Позже появились работы, доказывающие, что взаимодействие с-Met с InlB приводит к продукции перитонеальными дендритными клетками про-воспалительного цитокина IL6

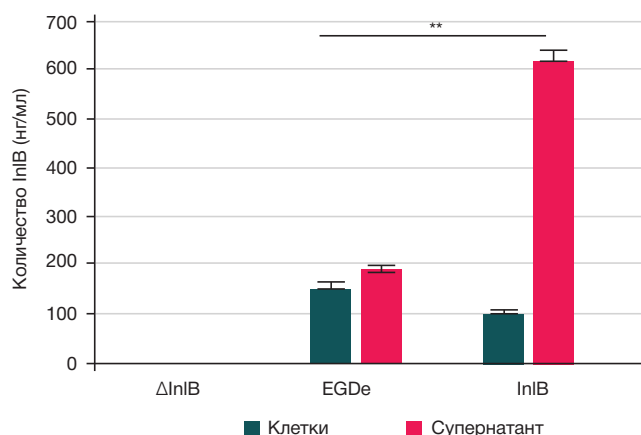


Рис. 5. Уровень продукции InlB штаммами *L. monocytogenes* через 18 ч культивирования. Штамм Δ InlB — не экспрессирует InlB, штамм EGDe на клеточной поверхности содержит $149,2 \pm 13,3$ нг/мл и $187,3 \pm 9,8$ нг/мл в супернатанте, штамм InlB на клеточной поверхности содержит $100,7 \pm 4,2$ нг/мл и $614,6 \pm 23$ нг/мл; ** — $p < 0,01$ ($n = 3$)

[16]. В то же время в нашей работе дозозависимый эффект наблюдался после захвата листерий макрофагами, что может указывать на роль внутриклеточных рецепторов InlB. Таким рецептором может быть gC1qR, для которого были описаны как внеклеточная, так и внутриклеточная локализация. Не исключено также существование еще не описанных внутриклеточных рецепторов InlB.

Наши результаты продемонстрировали, что InlB оказывает негативное влияние на уклонение листерий от врожденного иммунитета. В то же время InlB необходим для полноценной инвазии в клетки непрофессиональных фагоцитов. Баланс между взаимодействием с клетками иммунной системы и таргетными клетками организма может определять вирулентность разных штаммов *L. monocytogenes*.

ВЫВОД

Целью данной работы было изучение влияния фактора патогенности *L. monocytogenes* InlB на взаимодействие листерий с макрофагами человека. Наши результаты показали, что InlB статистически значимо улучшает захват листерий макрофагами и уменьшает выживание / размножение листерий внутри макрофагов. Таким образом, мы впервые показали, что InlB оказывает негативное влияние на уклонение листерий от врожденного иммунитета. Баланс между положительным эффектом InlB на взаимодействие *L. monocytogenes* с непрофессиональными фагоцитами и отрицательным эффектом на уклонение листерий от врожденного иммунитета и механизмы поддержания этого баланса должны быть более детально изучены для лучшего понимания процессов взаимодействия возбудителя с разными типами клеток в организме.

Литература

- Murray E, Webb R, Swann M. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear monocytois, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. J Pathol Bacteriol. 1926; 29: 407–39.
- Vázquez-boland J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domi G, González-zorn B, et al. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants *Listeria* Pathogenesis and Molecular
- Virulence Determinants. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 584–640.
- Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: A resurgent foodborne infection. Clin Microbiol Infect. 2010; 16: 16–23.
- Braun L, Cossart P. Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. Microbes Infect. 2000; 2: 803–11.
- Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine

- kinase. *Cell*. 2000; 103: 501–10.
6. Cossart P. Met, the HGF-SF receptor: another receptor for *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol*. 2001; 9: 105–7.
7. Organ S, Tsao M. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011; 3: 7–9.
8. Chen Q, DeFrances MC, Zarnegar R. Induction of Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor) expression during human monocyte-macrophage differentiation. *Cell Growth Differ*. 1996; 7: 821–32.
9. Nishikoba N, Kumagai K, Kanmura K, Nakamura Y, Ono M, Eguchi H, et al. HGF-MET Signaling Shifts M1 Macrophages Toward an M2-Like Phenotype Through PI3K-Mediated Induction of Arginase-1 Expression. *Front Immunol*. 2020; 11: 1–10.
10. Ghebrehiwet B, Lim B, Peerschke E, Willis A, Reid K. Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kDa cell surface glycoprotein that binds to the globular heads of C1q. *J Exp Med*. 1994; 179: 1809–21.
11. Ghebrehiwet B, Peerschke E. Structure and function of gC1q-R a multiligand binding membrane protein. *Immunobiology*. 1998; 199: 225–38.
12. Chalenko Y, Kalinin E, Marchenkov V, Sysolyatina E, Surin A, Sobyenin K, et al. Phylogenetically Defined Isoforms of *Listeria monocytogenes* Invasion Factor InlB Differently Activate Intracellular Signaling Pathways and Interact with the Receptor gC1q-R. *Int J Mol Sci*. 2019; 20: 1–15.
13. Chalenko Y, Kolbasova O, Pivova E, Abdulkadieva M, Povolyaeva O, Kalinin E. *Listeria monocytogenes* Invasion Into Sheep Kidney Epithelial Cells Depends on InlB, and Invasion Efficiency Is Modulated by Phylogenetically Defined InlB Isoforms. *Front Microbiol*. 2022; 13: 1–14.
14. Sobyenin K, Sysolyatina E, Krivobuzov M, Chalenko Y, Karyagina A, Ermolaeva S. Naturally occurring InlB variants that support intragastric *Listeria monocytogenes* infection in mice. *FEMS Microbiol Lett*. 2017; 1: 1–8.
15. Nepomuceno R, Tenner A. C1qRP, the C1q receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets. *J Immunol*. 1998; 160: 1929–35.
16. Mansell A, Braun L, Cossart P, O'Neill L. A novel function of InlB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappaB in J774 macrophages. *Cell Microbiol*. 2000; 2: 127–36.
17. Calame D, Mueller-Ortiz S, Wetsel R. Innate and adaptive immunologic functions of complement in the host response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunobiology*. 2016; 221: 1407–17.
18. Fuss I, Kanof M, Smith P, Zola H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol*. 2009; 85: 1.1–7.1.8.
19. Huang X, Li Y, Fu M, Xin H. Polarizing Macrophages In Vitro. Germain Rousselet (ed.), *Macrophages: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. 2018; 1784: 119–26.
20. Werbrouck H, Grijspeerdt K, Botteldoorn N, Pamel E, Rijpens N, Damme J, et al. Differential inlA and inlB Expression and Interaction with Human Intestinal and Liver Cells by *Listeria monocytogenes* Strains of Different Origins. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72 (6): 3862–71.

References

1. Murray E, Webb R, Swann M. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear monocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J Pathol Bacteriol*. 1926; 29: 407–39.
2. Vázquez-boland J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domi G, González-zorn B, et al. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14: 584–640.
3. Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: A resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16: 16–23.
4. Braun L, Cossart P. Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes Infect*. 2000; 2: 803–11.
5. Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*. 2000; 103: 501–10.
6. Cossart P. Met, the HGF-SF receptor: another receptor for *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol*. 2001; 9: 105–7.
7. Organ S, Tsao M. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011; 3: 7–9.
8. Chen Q, DeFrances MC, Zarnegar R. Induction of Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor) expression during human monocyte-macrophage differentiation. *Cell Growth Differ*. 1996; 7: 821–32.
9. Nishikoba N, Kumagai K, Kanmura K, Nakamura Y, Ono M, Eguchi H, et al. HGF-MET Signaling Shifts M1 Macrophages Toward an M2-Like Phenotype Through PI3K-Mediated Induction of Arginase-1 Expression. *Front Immunol*. 2020; 11: 1–10.
10. Ghebrehiwet B, Lim B, Peerschke E, Willis A, Reid K. Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kDa cell surface glycoprotein that binds to the globular heads of C1q. *J Exp Med*. 1994; 179: 1809–21.
11. Ghebrehiwet B, Peerschke E. Structure and function of gC1q-R a multiligand binding membrane protein. *Immunobiology*. 1998; 199: 225–38.
12. Chalenko Y, Kalinin E, Marchenkov V, Sysolyatina E, Surin A, Sobyenin K, et al. Phylogenetically Defined Isoforms of *Listeria monocytogenes* Invasion Factor InlB Differently Activate Intracellular Signaling Pathways and Interact with the Receptor gC1q-R. *Int J Mol Sci*. 2019; 20: 1–15.
13. Chalenko Y, Kolbasova O, Pivova E, Abdulkadieva M, Povolyaeva O, Kalinin E. *Listeria monocytogenes* Invasion Into Sheep Kidney Epithelial Cells Depends on InlB, and Invasion Efficiency Is Modulated by Phylogenetically Defined InlB Isoforms. *Front Microbiol*. 2022; 13: 1–14.
14. Sobyenin K, Sysolyatina E, Krivobuzov M, Chalenko Y, Karyagina A, Ermolaeva S. Naturally occurring InlB variants that support intragastric *Listeria monocytogenes* infection in mice. *FEMS Microbiol Lett*. 2017; 1: 1–8.
15. Nepomuceno R, Tenner A. C1qRP, the C1q receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets. *J Immunol*. 1998; 160: 1929–35.
16. Mansell A, Braun L, Cossart P, O'Neill L. A novel function of InlB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappaB in J774 macrophages. *Cell Microbiol*. 2000; 2: 127–36.
17. Calame D, Mueller-Ortiz S, Wetsel R. Innate and adaptive immunologic functions of complement in the host response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunobiology*. 2016; 221: 1407–17.
18. Fuss I, Kanof M, Smith P, Zola H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol*. 2009; 85: 1.1–7.1.8.
19. Huang X, Li Y, Fu M, Xin H. Polarizing Macrophages In Vitro. Germain Rousselet (ed.), *Macrophages: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. 2018; 1784: 119–26.
20. Werbrouck H, Grijspeerdt K, Botteldoorn N, Pamel E, Rijpens N, Damme J, et al. Differential inlA and inlB Expression and Interaction with Human Intestinal and Liver Cells by *Listeria monocytogenes* Strains of Different Origins. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72 (6): 3862–71.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБЩЕДОСТУПНЫХ МЕТОДОВ ТРАНСФЕКЦИИ МОДЕЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ ЗАДАЧ БИОТЕХНОЛОГИИ

П. О. Воробьев¹, Д. В. Кочетков¹, К. В. Василенко², А. В. Липатова¹✉

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

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Краткосрочная экспрессия генов является одним из самых широко используемых методов в молекулярной биологии, как в исследовательских проектах, так и для решения задач биотехнологической промышленности. Несмотря на то что существующие коммерческие трансфекционные агенты позволяют добиться эффективной трансфекции и высокой экспрессии целевых генов в клетках, масштабирование производственного процесса часто затруднительно из-за высокой стоимости таких агентов. Хорошо описанные методы катионной или кальций-фосфатной трансфекции доступны и дают воспроизводимые результаты при значительно меньшей себестоимости. Целью исследования было проверить методы кальций-фосфатной трансфекции, катионной трансфекции (PEI) и коммерчески доступного реагента TurboFect на эффективность монотрансфекции и котрансфекции на панели широко используемых клеточных линий, таких как HEK293T, HUH7, BHK-21, CHO, MRC5. Эффективность трансфекции плазмидными конструкциями, несущими различные флуоресцентные белки, оценивали путем проведения проточной цитофлуориметрии. Среди всех методов кальций-фосфатная трансфекция позволяет добиться максимально эффективной доставки плазмидной ДНК во всех клеточных линиях, использованных в нашем исследовании, кроме BHK21 — для нее катионная трансфекция с использованием PEI оказалась эффективнее, и сопоставима по эффективности с кальций-фосфатным методом в клеточных линиях CHO.

Ключевые слова: кальций-фосфатная трансфекция, полиэтиленимин, котрансфекция, трансфекция, лентивирусы

Финансирование: проект был поддержан Российским научным фондом (Соглашение № 20-75-10157 от 14 августа 2020 г. «Изучение возможностей получения рекомбинантных штаммов онколитических вирусов с опухоль-специфической репликацией и экспрессией иммуномодулирующих белков»).

Вклад авторов: П. О. Воробьев, Д. В. Кочетков, К. В. Василенко, А. В. Липатова внесли равнозначный вклад в проведение лабораторных экспериментов, подготовку рисунков и интерпретацию результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ **Для корреспонденции:** Анастасия Валерьевна Липатова
ул. Вавилова, д. 32/1, г. Москва, 119991, Россия; lipatovaanv@gmail.com

Статья получена: 22.04.2022 **Статья принята к печати:** 30.05.2022 **Опубликована онлайн:** 23.06.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.031

COMPARATIVE EFFICIENCY OF ACCESSIBLE TRANSFECTION METHODS IN MODEL CELL LINES FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Vorobyev PO¹, Kochetkov DV¹, Vasilenko KV², Lipatova AV¹✉

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Transient gene expression is one of the most common methods in molecular biology, equally relevant for basic research projects and biotechnological industries. Despite the existence of commercial transfection systems, which afford high transfection efficiency and high expression levels of reporter genes, expanding such systems to industrial scales is often problematic due to high costs of the reagents. The well-described methods of cationic and calcium-phosphate transfection are accessible and ensure reproducible results at much lower costs. This study is aimed at comparative validation of calcium phosphate and cationic (polyethylenimine-based) transfection protocols along with the commercially available TurboFect reagent for mono- and cotransfections on a panel of commonly used cell lines including HEK293T, Huh7, BHK-21, CHO and MRC5. The efficiency of transfection with plasmid constructs encoding different fluorescent proteins was measured by flow cytometry. Of all the tested methods, calcium phosphate transfection afforded the highest efficiency of plasmid DNA delivery in all the cell lines except BHK21, for which the PEI method turned out to be more efficient than calcium phosphate transfection, and CHO, for which both methods showed comparable efficiency.

Keywords: calcium phosphate transfection, polyethylenimine, cotransfection, transfection, lentiviruses

Funding: the project was supported by the Russian Science Foundation (grant number 20-75-10157 of August 14, 2020 "Research on the possibilities of obtaining recombinant strains of oncolytic viruses with tumor-specific replication and immunomodulatory protein expression").

Author contribution: Vorobyev PO, Kochetkov DV, Vasilenko KV and Lipatova AV participated equally in the laboratory experiments, preparation of the figures and interpretation of the results.

Compliance with ethical standards: the study complies with the requirements of the World Medical Association Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anastasia V. Lipatova
Vavilova, 32/1, Moscow, 119991, Russia; lipatovaanv@gmail.com

Received: 22.04.2022 **Accepted:** 30.05.2022 **Published online:** 23.06.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.031

Трансфекция — это процесс доставки экзогенной ДНК или РНК в эукариотическую клетку [1], широко используемый для наработки рекомбинантных белков [2] и введения репортерных конструкций для изучения самых разнообразных сигнальных путей [3–6]. Особенно важную роль в развитии метода сыграли исследования

инфекционности вирусных геномов [7]. В настоящее время трансфекция незаменима для создания рекомбинантных вирусных штаммов, а также наработки лентивирусных и аденоассоциированных вирусных векторов [8, 9].

Химические методы трансфекции классифицируют по типам реакционных агентов: фосфат кальция,

полиэтиленимин (PEI), катионные полимеры (хитозан), липосомы, полиамидамины (PAMAM) [10]. Все эти методы имеют свои преимущества и недостатки, выбор одного из них зависит от баланса цитотоксичности и эффективности введения генетической конструкции в клетку [11]. Существует широкий спектр готовых коммерческих решений, таких как Lipofectamine 3000, TurboFect, SuperFect, FuGENE HD [12], однако доступные и хорошо изученные методы кальций-фосфатной и катионной трансфекции все еще широко применяют [10].

Кальций-фосфатная трансфекция (КФТ) была впервые описана в 1973 г. [13], ее применяли для изучения инфекционности геномной ДНК аденовируса, однако сам механизм действия кальций-фосфатных преципитатов как трансфекционных комплексов был описан спустя 17 лет [14]. Было показано, что доставка экзогенной ДНК происходит через эндосомы напрямую в ядро. С этого момента началось активное применение метода. Традиционный протокол основан на копреципитации кальция и ДНК с формированием гидроксиапатита ДНК, который образуется в строгих химико-физических условиях перенасыщенного раствора, определенном диапазоне температур и концентраций кальция и фосфата. В связи с этим хорошая воспроизводимость протокола требует определенной методической подготовки [15–18]. На сегодняшний день существуют модификации стандартного метода КФТ, которые позволяют обойти ограничения традиционного способа [19, 20].

Другим доступным и распространенным методом трансфекции является катионная трансфекция с использованием полиэтиленимина (polyethylenimine, PEI) [10, 21], модификацией которой стало использование коммерчески доступного TurboFect. Один из определяющих факторов эффективности этого метода — соотношение ДНК/PEI, а также молекулярный вес PEI, уменьшение которого снижает цитотоксичность и эффективность, и наоборот. Коммерческие решения в большинстве своем предлагают PEI с молекулярным весом 25 кДа [22]. На рынке представлена также химическая модификация высокомолекулярного PEI со сниженной цитотоксичностью PEI «MAX» 40 кДа [10, 23]. Бесспорным преимуществом PEI являются его высокая трансфекционная активность, простота использования и универсальность. Один из серьезных недостатков — его непригодность к длительному хранению, обусловленная окислением PEI атмосферным кислородом, но предложено частичное решение данной проблемы [24]: разведение PEI в 0,2 М соляной кислоте позволяет продлить срок его хранения, а снизить уровень цитотоксичности позволяет разведение смеси PEI/ДНК в лактатном буфере.

Широко используемый трансфекционный реагент Lipofectamine 3000 обладает исключительной эффективностью, хорошо хранится при +4 °С, однако его цена для одного эксперимента по трансфекции 10 млн клеток составляет более 50 USD, данная ценовая категория трансфекционных реагентов в статье не будет рассмотрена.

Одновременная доставка нескольких генетических конструкций часто необходима в рамках решения задач синтетической биологии, создания рекомбинантных вирусных штаммов [8, 9], наработки лентивирусных и аденоассоциированных вирусных частиц, а также для широкого ряда методов биотехнологической промышленности. Подобные эксперименты связаны с трансфекцией большого объема клеток [25]. Применение

готовых коммерческих наборов является удобным, воспроизводимым вариантом, однако их высокая стоимость и логистические проблемы, связанные с отсутствием отечественных аналогов, создают некоторую проблему выбора. Целью нашего исследования было сравнить эффективность КФТ, PEI и готового коммерческого реагента TurboFect для одновременной трансфекции тремя репортерными плазмидными конструкциями и количественно оценить эффективность методом проточной цитометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии

Линии HEK293T (ATCC #CRL-3216), BHK21 (ATCC #C-13), MRC5 (ATCC #CCL-171), CHO K1 (ATCC #CCL-61) были приобретены в коллекции ATCC (American Type Culture Collection; США), клеточные линии CHO DG-44 и HUH7 были любезно предоставлены А. В. Ивановым (ИМБ РАН; Россия) из коллекции клеточных линий лаборатории биохимии вирусных инфекций ИМБ РАН. Клетки культивировали на среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 10% FBS (HyClone, США) в присутствии антибиотиков в стандартных концентрациях (пенициллин 50 ед./мл и стрептомицин 50 мкг/мл); CHO DG-44 культивировали на DMEM/F12 (PanEco; Россия) с 10% FBS и антибиотиками.

Плазмидные конструкции и трансфекционные реагенты

Плазмидные конструкции, кодирующие флуоресцентные белки (Katushka, BFP и eGFP), были клонированы в вектор pL-CMV-PL4-Puro, разработанный ранее в лаборатории пролиферации клеток (ИМБ РАН; Россия). После подтверждения успешной инсерции и секвенирования соответствующих фрагментов плазмидные конструкции были наработаны в бактериях штамма TOP-10 (New England Biolabs; США) в объеме 200 мл среды LB, после чего из бактериального осадка была выделена плазмидная ДНК с использованием набора Plasmid Midiprep 2.0 (Евроген; Россия). Чистоту полученной ДНК оценивали путем спектрометрического анализа (Nanodrop 2000; ThermoFisher, США) по соотношению поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (для используемых образцов соотношение было от 1,9 и выше).

За сутки до трансфекции на шестилуночный планшет клетки были посеяны в количестве $1,5 \times 10^5$ в объеме 4 мл среды DMEM с 10% фетальной бычьей сыворотки в условиях инкубатора при 37 °С при 5% CO₂.

Трансфекцию с использованием PEI проводили как было описано ранее [24].

Сухой PEI (Polysciences Inc., USA; Cat# 23966) растворяли в 0,2М HCl до концентрации 5 мкг/мкл, затем аликвотировали и подвергнули отсроченному хранению при –80 °С. Лактатный буфер (20 мМ лактата натрия, 150 мМ NaCl, pH 4,0) хранили при +4 °С.

В день эксперимента смешивали 3 мкг ДНК и 150 мкл лактатного буфера. Отдельно смешивали 15 мкг PEI и 150 мкл лактатного буфера. Растворы ДНК в лактатном буфере и PEI в лактатном буфере перемешивали на вортексе и смешивали между собой, выдерживали при комнатной температуре 10–15 мин, после чего капельно добавляли в культуральную среду. При последовательном

добавлении в 300 мкл лактатного буфера ДНК и PEI эффективность трансфекции сохранялась (данные не приведены). Анализ флуоресценции проводили через 48 ч.

Кальций-фосфатную трансфекцию проводили в соответствии с опубликованной ранее методикой [26].

За час до трансфекции среду меняли на DMEM (Gibco), содержащий 10% FBS (HyClone), для шестилуночного планшета объем среды составлял 2,25 мл. Двукратный HBS (табл. 1) объемом 125 мкл был смешан с равным объемом ДНК (3 мкг) / 2 М $\text{CaCl}_2/\text{dH}_2\text{O}$, молярность CaCl_2 в итоговой смеси ДНК / CaCl_2 / dH_2O должна составлять 148 мМ. Далее 2× HBS, буфер смешивали с ДНК/ $\text{CaCl}_2/\text{dH}_2\text{O}$ при постоянном перемешивании и инкубировали 10–20 мин при комнатной температуре. Капельно добавляли в культуральную среду. Спустя 14 ч проводили шок клеточной мембраны. Для этого культуральную среду удаляли и добавляли 1 мл 10%-го раствора ДМСО в PBS. После инкубации в течение 2,5 мин клетки дважды промывали 3 мл PBS, затем добавляли свежую культуральную среду.

Трансфекцию с помощью TurboFect™ проводили в соответствии с рекомендациями производителя. В день эксперимента 4 мкг плазмидной ДНК смешивали с бессывороточной средой DMEM, после чего добавляли 6 мкл реагента TurboFect, который предварительно тщательно перемешивали на вортексе, инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин и капельно добавляли в культуральную среду.

Оценка жизнеспособности клеток

Эксперименты по оценке жизнеспособности проводили с помощью 24-луночных планшетов. Оценку проводили спустя 24 ч после трансфекции, так как при более длительной инкубации в результате пролиферации клеток сложно оценить разницу в токсических эффектах. Использовали стандартный МТТ-тест. Раствор МТТ (Диа-М; Россия) приготавливали в PBS в концентрации 5 мкг/мл. Инкубация с клетками длилась 3 ч, после чего среду удаляли и добавляли 300 мкл ДМСО (ПанЭко; Россия). В качестве контролей использовали клетки без обработки. Детекцию проводили с использованием планшетного ридера CLARIOSTAR (BMG LABTECH; США) путем измерения поглощения на длине волны 595 нм с нормализацией по длине волны 490 нм.

Проточная цитометрия и обработка данных

Количественную оценку флуоресценции определяли с помощью цитофлуориметра BD LSR Fortessa (Beckman Dickinson; США). Детекцию проводили в каналах PE (561/(586/15) нм — Katushka), FITC (488/(530/30) нм — eGFP) и Pacific Blue (405/(450/50) нм — tagBFP). Настройку компенсации, а также первичную обработку данных проводили с помощью программного обеспечения FACS Diva. Дальнейший анализ выполняли с использованием программы Flowing Software 2.0 (Perttu Terho; Центр биотехнологии Турку, Финляндия). Исследование проводили в трех независимых экспериментах (каждый в трех биологических повторностях).

Наработка лентивирусных стоков и оценка их титра

Для наработки лентивирусных частиц использовали плазмидные конструкции с упаковочными белками pREV, pGAG-pol, p-VSV-G и pL-CMV-eGFP-puro из

Таблица 1. Состав 2× hepes buffer saline (HBS)

NaCl	280 мМ
KCl	10 мМ
Na_2HPO_4	1,5 мМ
Декстроза / глюкоза	12 мМ
HEPES pH 7,05	50 мМ

коллекции лаборатории пролиферации клеток (ИМБ РАН; Россия). Клетки HEK293T высевали на чашки Петри в конfluence 35%, на следующий день трансфецировали плазмидами (в соотношении 2 : 1 : 1 : 4 в соответствии с порядком перечисления) согласно одной из описанных выше методик [27]. Спустя 16 ч культуральную среду заменяли на DMEM с 2% FBS. Еще через 8 ч собирали первый сток и затем дважды в сутки повторяли сбор лентивирусных частиц. Оценку вирусного титра объединенных пяти стоков проводили модифицированным методом конечных разведений на линии HEK293T. Приготавливали 10-кратные серийные разведения лентивируса в бессывороточной среде DMEM, затем добавляли к свежей культуре, высаженной на 48-луночные планшеты, по 15 000 клеток на лунку. Среду заменяли на DMEM с 2% FBS и добавляли разведения лентивирусных стоков. Опыт проводили в четырех технических параллелях. Спустя 72 ч проводили подсчет флуоресцентных блюшек в лунках с максимально разведенным вирусом.

Статистический анализ результатов

Статистический анализ проводили в программном пакете GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc.; Ла-Хойя, Калифорния, США). Для анализа достоверности статистических различий использовали однофакторный ANOVA-анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка жизнеспособности клеток после трансфекции

Спустя 24 ч после добавления к клеткам трансфекционных реагентов и ДНК проводили оценку жизнеспособности методом МТТ-анализа (рис. 1).

Как видно из полученных данных, более 80% клеток всех исследуемых линий успешно переживают процедуру трансфекции. Через 48 ч после проведения трансфекции оценка жизнеспособности не является информативной, так как в связи с эффектом контактного торможения количество клеток в контрольных лунках не увеличивается после достижения полной конfluence, в то время как трансфецированные клетки продолжают пролиферировать.

Оценка эффективности монотрансфекции

Для сравнения эффективности КФТ и трансфекции с помощью PEI была проведена трансфекция плазмидной конструкцией (pL-CMV-Katushka-puro) (рис. 2).

Была проведена оптимизация следующих условий:

- время инкубации клеток с ДНК/кальций-фосфатным преципитатом (6 и 14 ч);
- использование шока клеточной мембраны, вызываемого инкубацией с ДМСО в течение 2,5 мин.

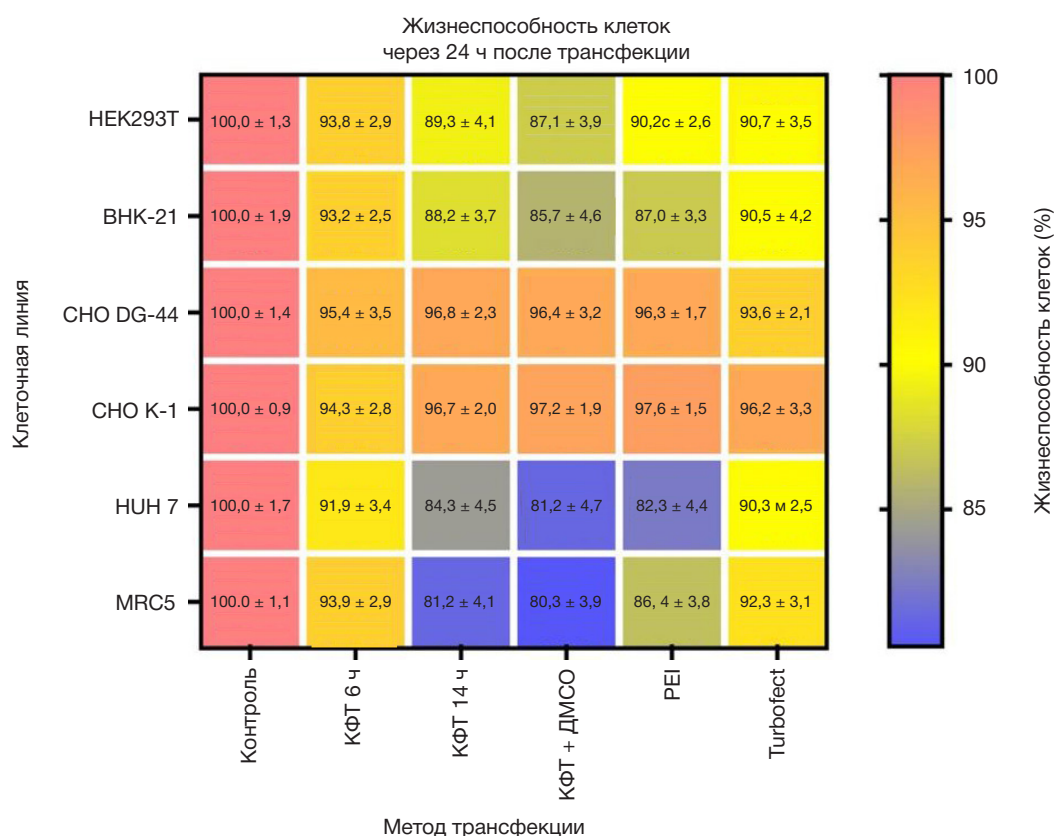


Рис. 1. Оценка жизнеспособности клеточных линий после проведения трансфекции с PEI, Turbofect или КФТ в сравнении с нетрансфицированными клетками методом МТТ-анализа

Инкубация в течение 14 ч с ДНК/кальций-фосфатным преципитатом для клеточных линий HEK293T и CHO K-1 приводит к увеличению числа трансфицированных клеток с 27% при шестичасовой до 97% при инкубации в течение 14 ч (p -value < 0,01) для HEK293T и с 1,5 до 13% для CHO K-1, соответственно (p -value < 0,01). Тогда как клеточные линии MRC5 и HUH7 показали снижение числа трансфицированных клеток с 25 до 3% (p -value < 0,01) для MRC5, с 8 до 1% (p -value < 0,01) — для HUH7.

Инкубация клеток с 10% ДМСО приводила к значительному увеличению доли трансфицированных клеток только для клеточной линии MRC5 (p -value < 0,05). На всех исследованных клеточных линиях, за исключением BHK-21 КФТ, она оказалась более эффективной. Трансфекция с применением PEI также оказалась эффективным методом для большинства линий со сравнимым цитотоксическим эффектом на клетках.

Для линий HEK293T и CHO DG-44 была проведена проверка влияния культуральной среды на эффективность КФТ (рис. 2А, В). Для линии CHO DG-44 было показано заметное увеличение числа трансфицированных клеток на среде DMEM/F12 (p -value < 0,01). Для образцов на среде DMEM/F12 ДМСО-шок клеточной мембраны достоверно не повышал эффективность.

Оценка эффективности котрансфекции

На следующем этапе исследования мы проверили эффективность трансфекции двумя плазмидными конструкциями, кодирующими флуоресцентные белки eGFP и Katushka (рис. 3А; табл. 2). Наиболее эффективно проходит котрансфекция клеточной линии HEK293T, для CHO КФТ оказалось лучше, чем PEI (p -value < 0,01). Трансфекция с применением TurboFect была наименее

эффективной. Микрофотографии результатов КФТ на линии HEK293T представлены на рис. 4.

Оценку эффективности котрансфекции тремя плазмидными конструкциями, кодирующими флуоресцентные белки BFP, eGFP и Katushka, также проводили методом проточной цитометрии (рис. 5). Тенденции, отмеченные при трансфекции двумя генетическими конструкциями, сохраняются. Процент клеток, трансфицированных одновременно тремя плазмидными конструкциями, ожидаемо снижается (рис. 3Б; табл. 3). Анализ результатов проточной цитометрии проводили в соответствии с параметрами, приведенными на рис. 5. Популяции положительных по флуоресценции клеток отделялись по границе аутофлуоресценции нетрансфицированных клеток.

Из полученных результатов следует, что общедоступные методы химической трансфекции демонстрируют очень высокую эффективность при моно- и котрансфекциях, сравнимую с самыми эффективными коммерчески доступными системами FuGENE и Lipofectamine 3000 [28].

Оценка эффективности сборки лентивирусных частиц, несущих интеграционную кассету с eGFP

Лентивирусную трансдукцию широко применяют для получения клеточных сублиний, стабильно экспрессирующих экзогенные белки, для репрограммирования клеток и многих других задач молекулярной и клеточной биологии. Для наработки лентивирусных стоков необходимо трансдуцировать упаковочную линию клеток HEK293T тремя или четырьмя плазмидными конструкциями, кодирующими белки HIV-1, гликопротеид VSV-G, а также плазмидой, несущей целевой трансген. Эффективность сборки частиц зависит от эффективности трансфекции и жизнеспособности клеток. Для решения этой практической

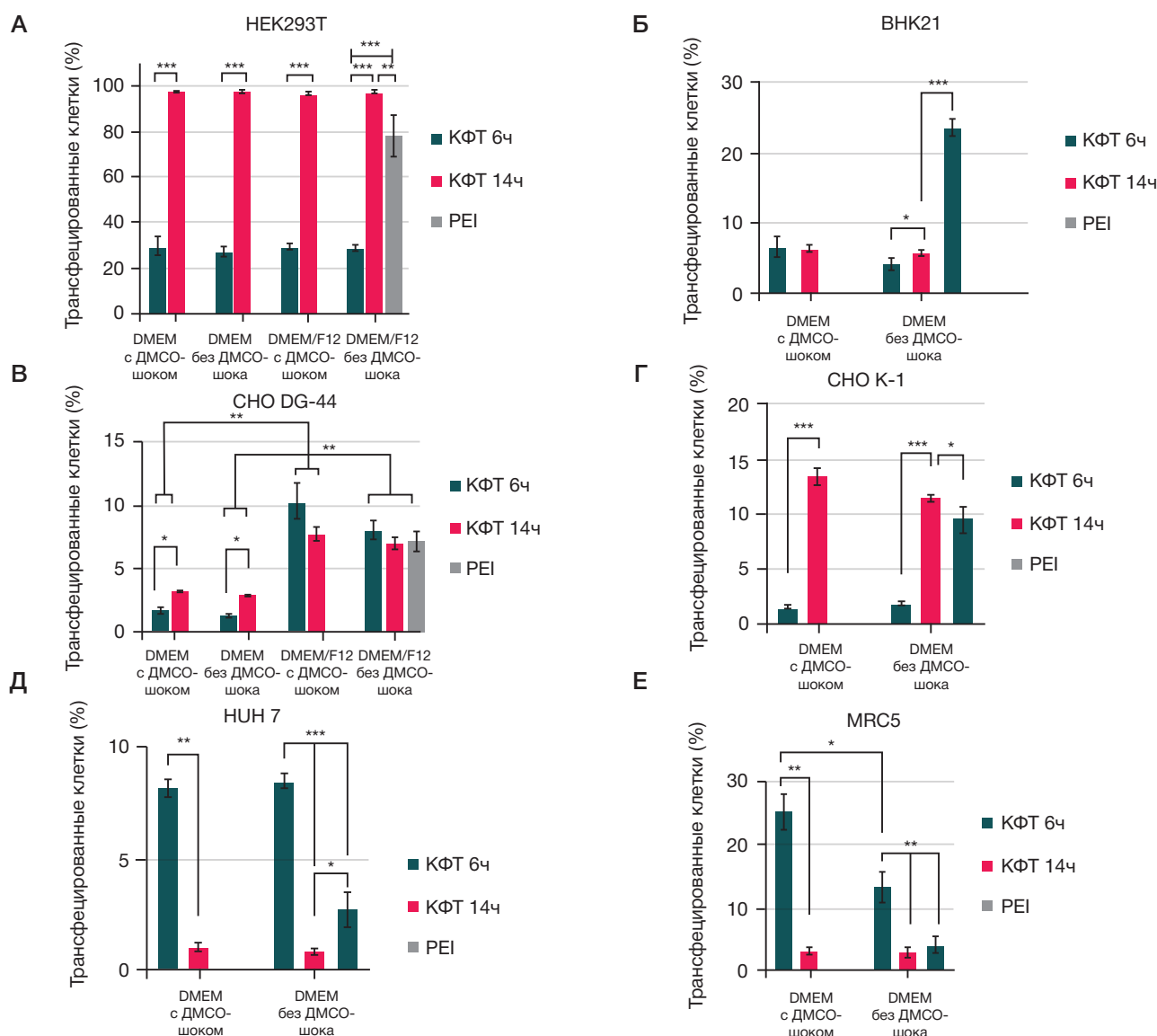


Рис. 2. Оценка эффективности КФТ и трансфекции PEI плазмидной конструкцией, несущей флуоресцентный белок Katushka, на различных модельных клеточных линиях: HEK293T (А), BHK-21 (Б), CHO DG-44 (В), CHO K-1 (Г), HUH7 (Д), MRC5 (Е). КФТ 6 ч — кальций-фосфатная трансфекция 6 ч инкубации; КФТ 14 ч — 14 ч инкубации

задачи на основании полученных ранее данных были выбраны методы КФТ + ДМСО, PEI и Turbofect.

Трансфекцию проводили на 6 млн клеток (чашка Петри диаметром 10 см в конфлюэнтности 70%). Титр лентивирусных частиц оценивали методом конечных разведений (рис. 6).

Эффективность наработки лентивирусных частиц максимальна в случае использования КФТ (9×10^5 и.е./мл), PEI дает сравнимый результат (105 и.е./мл), однако титр достоверно ниже (p -value < 0,05), как и в случае Turbofect (6×10^4 и.е./мл; p -value < 0,01).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Методы химической трансфекции демонстрируют различную токсичность и эффективность трансфекции в зависимости от их химической природы и соотношения ДНК и трансфекционного реагента. На эффективность трансфекции влияют многие параметры, при этом различия в условиях проведения экспериментов затрудняют детальное сравнение результатов в различных работах [16, 24]. В настоящем исследовании был проведен

сравнительный анализ эффективности трех методов трансфекции в нескольких клеточных линиях различного происхождения.

Среди всех линий наиболее эффективно трансфецируются клетки HEK293T. Данная линия широко используется для наработки рекомбинантных белков и лентивирусных стоков и является одной из самых изученных модельных линий. КФТ дает очень хороший воспроизводимый результат на данной линии (более 95% трансфецированных клеток). Для HEK293T время инкубации с ДНК / кальций / фосфатным преципитатом является ключевым фактором для увеличения эффективности трансфекции с 6 до 14 ч и составляет 29 и 97% соответственно (p -value < 0,01), тогда как роль шока клеточной мембраны не играет существенной роли, статистически значимой разницы не выявлено. Эффективность трансфекции КФТ и PEI составляет 68 и 21%, соответственно (p -value < 0,01) для трансфекции двумя плазмидными конструкциями, 40 и 15% соответственно (p -value < 0,01) для трехплазмидной котрансфекции. Эффективность же PEI и TurboFect составляет 21 и 5,9% для трансфекции двумя конструкциями и 15 и 5% — для трехплазмидной трансфекции (p -value < 0,01).

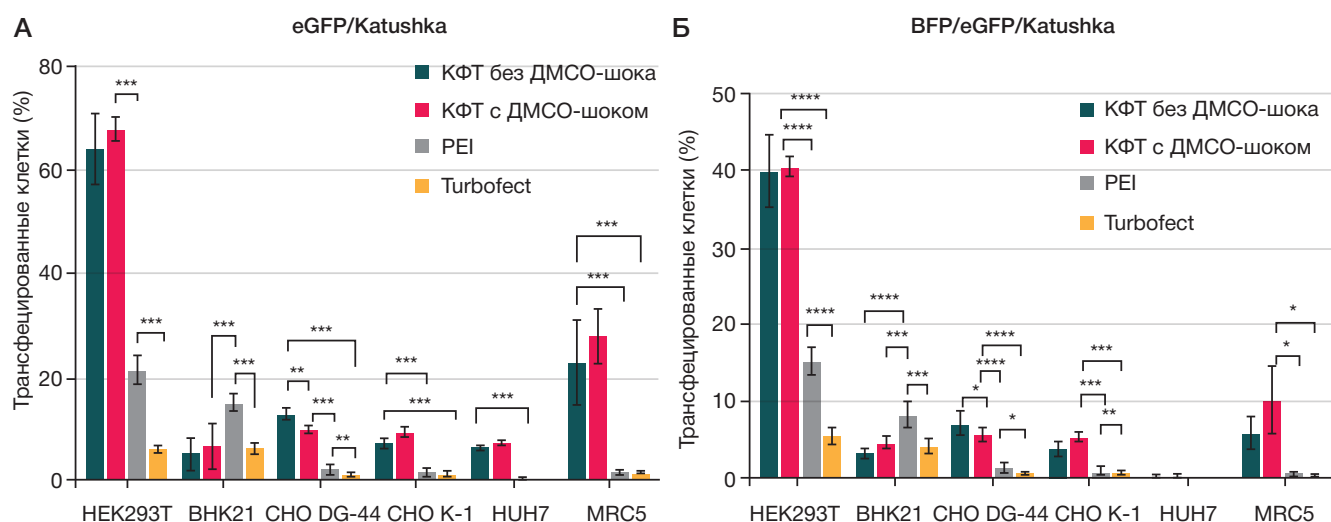


Рис. 3. Оценка эффективности котрансфекции двумя плазмидными конструкциями (eGFP/Katushka) (А) и тремя плазмидными конструкциями (BFP/eGFP/Katushka) (Б) на различных модельных клеточных линиях

Таблица 2. Количественная оценка доли клеток, трансфицированных двумя плазмидными конструкциями через 48 ч после трансфекции различными методами (выделены лучшие методы из использованных)

Клеточная линия	Доля клеток, котрансфицированных двумя плазмидными конструкциями, %			
	КФТ	КФТ + ДМСО	PEI	Turbofect
HEK293T	64,27 ± 6,85	68,1 ± 2,29 ($p < 0,001$)	21,33 ± 2,78	5,97 ± 0,61
BHK21	5 ± 3,11	6,6 ± 4,40	15 ± 1,85 ($p < 0,001$)	6,2 ± 0,86
CHO DG-44	12,87 ± 1,16 ($p < 0,001$)	9,85 ± 0,75	2,13 ± 0,92	1,05 ± 0,47
CHO K-1	7,1 ± 0,916	9,43 ± 0,93 ($p < 0,001$)	1,43 ± 0,83	1,13 ± 0,51
HUH7	6,93 ± 0,50	7,23 ± 0,55 ($p < 0,001$)	0,23 ± 0,16	0,09 ± 0,06
MRC5	22,7 ± 8,15	27,93 ± 5,25 ($p < 0,001$)	1,4 ± 0,56	1,55 ± 0,25

Таблица 3. Количественная оценка доли клеток, трансфицированных тремя плазмидными конструкциями через 48 ч после трансфекции различными методами (выделены лучшие методы из использованных)

Клеточная линия	Доля клеток, котрансфицированных тремя плазмидными конструкциями, %			
	КФТ	КФТ + ДМСО	PEI	Turbofect
HEK293T	39,83 ± 4,55	40,47 ± 1,27 ($p < 0,001$)	15,2 ± 1,75	5,57 ± 0,98
BHK21	3,3 ± 0,511	4,63 ± 0,80	8,23 ± 1,70 ($p < 0,001$)	4,16 ± 0,92
CHO DG-44	7,2 ± 1,52 ($p < 0,001$)	5,73 ± 0,99	1,33 ± 0,72	0,63 ± 0,09
CHO K-1	3,8 ± 0,92	5,4 ± 0,53 ($p < 0,001$)	0,93 ± 0,41	0,7 ± 0,19
HUH7	0,13 ± 0,06	0,2 ± 0,13 (ns)	0,09 ± 0,06	0,07 ± 0,06
MRC5	5,8 ± 2,02	10,17 ± 4,33 ($p < 0,05$)	0,43 ± 0,15	0,33 ± 0,15

Примечание: ns — незначимо.

Для оценки практической эффективности котрансфекций четырьмя плазмидными конструкциями, кодирующими упаковочные белки лентивируса, и одной, кодирующей целевой ген (eGFP), нами были получены лентивирусные стоки, которые эффективно трансдуцируют клетки, в результате чего можно наблюдать экспрессию eGFP. Лентивирусные стоки, полученные методом КФТ, имели самый высокий титр 9×10^5 и.е./мл, тогда как полученные с помощью PEI и TurboFect существенно более низкий 10^5 и.е./мл и 6×10^4 и.е./мл соответственно (p -value < 0,05).

Что касается линии ВНК-21, то КФТ продемонстрировала менее высокую эффективность, чем PEI, — 6,6 и 15% соответственно (p -value < 0,01) и 4,6% против 8,3% при тройной трансфекции (p -value < 0,01), что частично согласуется с опубликованными ранее данными [24]. Различие в результатах можно объяснить несколькими критически важными факторами, в частности, методом приготовления PEI. Одним из важных требований для сохранения высокой эффективности является оперативное приготовление раствора PEI без длительного хранения в сухом виде после производства, так как окисление PEI атмосферным кислородом снижает его эффективность [24]. Трансфекция PEI во многом оказалась эффективнее, чем Turbofect (11 и 6% соответственно, p -value < 0,01) для трансфекции двумя плазмидами и 8% против 4% при тройной трансфекции (p -value < 0,01). TurboFect хранится при +2–8 °С, и несоблюдение этих условий существенно снижает его эффективность, что могло бы объяснить низкие показатели его эффективности во всех проведенных нами экспериментах.

КФТ показала себя как эффективный метод и на других клеточных линиях, использованных в нашем исследовании в сравнении с PEI (p -value < 0,001 — для линий HEK293T, NuH7, CHO DG-44, CHO K-1 и p -value < 0,05 — для MRC5). Следует отметить, что шок клеточной мембраны, вызванный инкубацией с DMSO для клеточных линий CHO-K1 (p -value < 0,05) и MRC5, приводил к незначительному увеличению эффективности трансфекции, как при двойной, так и при тройной котрансфекции. Клетки линии NuH7 не были эффективно котрансфецированы ни одним из исследованных нами методов, однако монотрансфекция

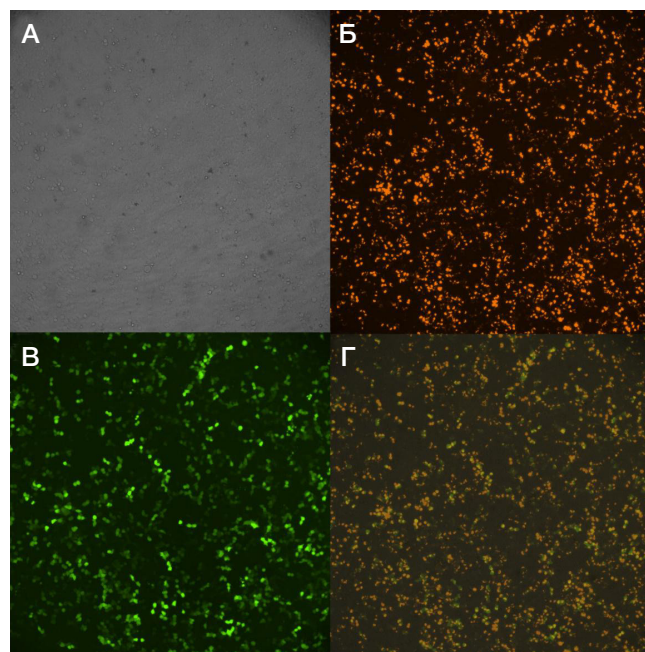


Рис. 4. Микрофотографии КФТ двумя генетическими конструкциями, кодирующими флуоресцентные белки (eGFP и Katushka). А. Светлое поле. Б. Katushka. В. eGFP. Г. Совмещенное изображение (увеличение $\times 40$)

КФТ с шоком мембраны приводила к трансфекции более 7% клеток.

Одним неоспоримым преимуществом PEI перед КФТ является простота применения для трансфекции суспензионных культур клеток, которые не были использованы в нашем исследовании. Клеточная линия Expi293, широко применяемая для наработки белков, может быть эффективно трансфецирована с использованием PEI вместо весьма дорогостоящего ExpiFectamine [29].

ВЫВОДЫ

Кальций-фосфатный метод позволяет добиться высокого уровня трансфекции и воспроизводимых результатов на панели клеточных линий широко используемых

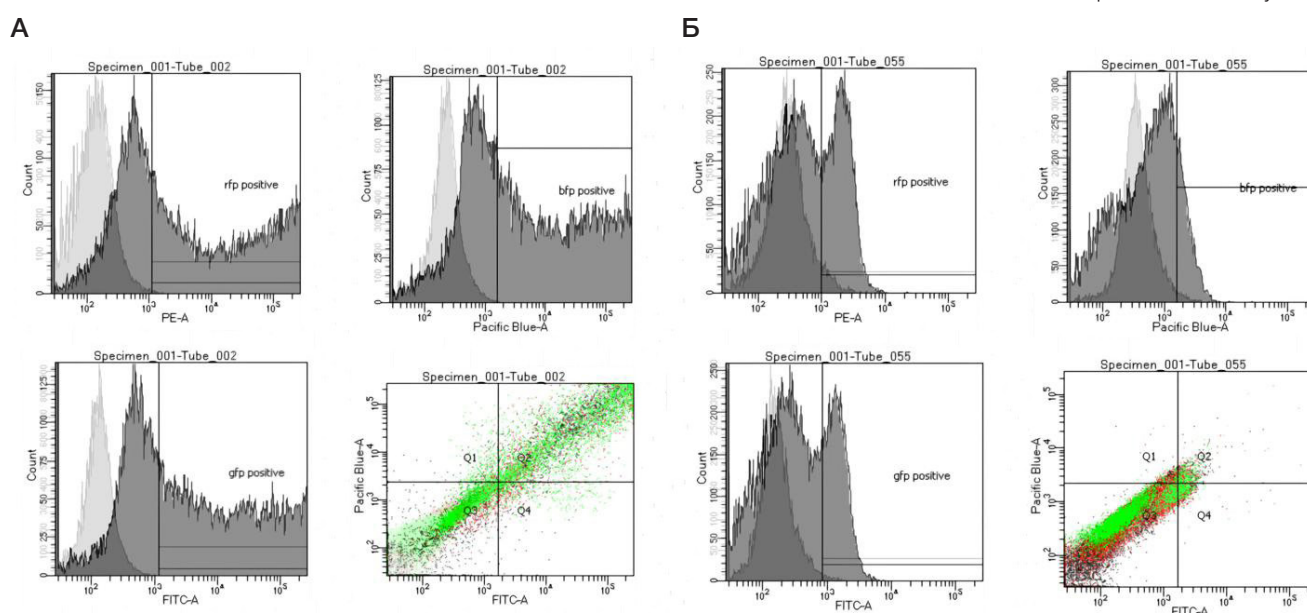


Рис. 5. Данные проточной цитометрии для клеточных линий HEK293T (А) и NuH7 (Б), светлый контур — нетрансфецированный контроль, темный — КФТ. Выделены популяции, положительные по флуоресценции соответствующих экспрессируемых белков (eGFP, Katushka, BFP), а также положительные по трем флуоресцентным меткам (Q2)

для исследовательских и биотехнологических задач. Его выполнение требует определенной методической подготовки, но при этом отсутствует проблема хранения трансфекционного агента, что гарантирует высокую воспроизводимость метода. Для задач получения лентивирусных стоков на клетках HEK293T данный метод дает очень хороший результат (9×10^5 и.е./мл без концентрирования), не уступающий готовым коммерческим лентивирусным частицам, что особенно актуально с учетом логистических сложностей. Катионная трансфекция PEI также демонстрирует высокую эффективность при сравнительно простом протоколе выполнения. Подготовка реактивов с учетом особенностей хранения делает метод простым для масштабирования без снижения эффективности. TurboFect дает приемлемые результаты, хотя эффективность этого трансфекционного реагента ниже. Тем не менее метод очень легкий в исполнении и хорошо подходит для небольших исследовательских задач. Однако высокая стоимость и длительная доставка не позволяют использовать его в качестве метода трансфекции для масштабных проектов.

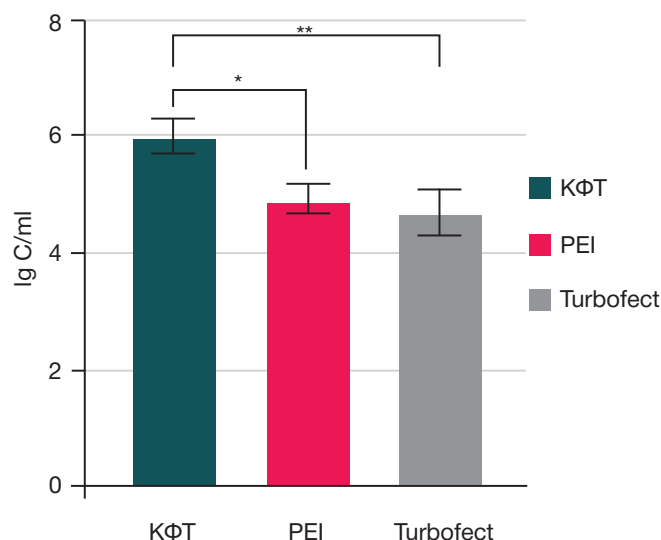


Рис. 6. Концентрация лентивирусных стоков, полученных на клетках HEK293T после трансфекции различными реагентами

Литература

- Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010; 397: 3173–8.
- Teixeira AP, Stucheli P, Auslander S, Auslander D, Schonenberger P, Hurlmann S, et al. CelloSelect — A synthetic cellobiose metabolic pathway for selection of stable transgenic CHO cell lines. *Metabolic Engineering*. 2022; 70: 23–30.
- Gu L, Kitamura M. Sensitive detection and monitoring of senescence-associated secretory phenotype by SASP-RAP assay. *PLoS One*. 2012; 7: e52305.
- Miura M, Yuan J. Transient transfection assay of cell death genes. *Methods in Enzymology*. 2000; 322: 480–92.
- Strebel A, Harr T, Bachmann F, Wernli M, Erb P. Green fluorescent protein as a novel tool to measure apoptosis and necrosis. *Cytometry*. 2001; 43: 126–33.
- Boulaiz H, Prados J, Melguizo C, Garcia AM, Marchal JA, Ramos JL, et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human breast cancer by transfection of gef gene. *British Journal of Cancer*. 2003; 89: 192–8.
- Vaheri A, Pagano JS. Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology*. 1965; 27: 434–6.
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 6108–13.
- Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Molecular Therapy*. 2008; 16: 698–706.
- Longo PA, Kavran JM, Kim MS, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods in Enzymology*. 2013; 529: 227–40.
- Jin L, Zeng X, Liu M, Deng Y, He N. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics*. 2014; 4: 240–55.
- Rahimi P, Mobarakeh VI, Kamalzare S, SajadianFard F, Vahabpour R, Zabihollahi R. Comparison of transfection efficiency of polymer-based and lipid-based transfection reagents. *Bratisl Lek Listy*. 2018; 119: 701–05.
- Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973; 52: 456–67.
- Orrantia E, Chang PL. Intracellular distribution of DNA internalized through calcium phosphate precipitation. *Experimental Cell Research*. 1990; 190: 170–4.
- Kingston RE, Chen CA, Okayama H. Calcium phosphate transfection. *Current protocols in immunology*. 2001; 31: 1–9.
- Olton D, Li J, Wilson ME, Rogers T, Close J, Huang L, et al. Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: influence of the synthesis parameters on transfection efficiency. *Biomaterials*. 2007; 28: 1267–79.
- Pedraza CE, Bassett DC, McKee MD, Nelea V, Gbureck U, Barralet JE. The importance of particle size and DNA condensation salt for calcium phosphate nanoparticle transfection. *Biomaterials*. 2008; 29: 3384–92.
- Sokolova VV, Radtke I, Heumann R, Eppe M. Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles. *Biomaterials*. 2006; 27: 3147–53.
- Cao X, Deng W, Wei Y, Su W, Yang Y, Wei Y, et al. Encapsulation of plasmid DNA in calcium phosphate nanoparticles: stem cell uptake and gene transfer efficiency. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6: 3335–49.
- Nouri A, Castro R, Santos JL, Fernandes C, Rodrigues J, Tomas H. Calcium phosphate-mediated gene delivery using simulated body fluid (SBF). *Int J Pharm*. 2012; 434: 199–208.
- Baker A, Saltik M, Lehrmann H, Killisch I, Mautner V, Lamm G, et al. Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive and effective reagent for condensing and linking plasmid DNA to adenovirus for gene delivery. *Gene Therapy*. 1997; 4: 773–82.
- Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szewczyk A. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Molecular Therapy*. 2005; 11: 990–5.
- Liu T, Yu X, Kan B, Guo Q, Wang X, Shi S, et al. Enhanced gene delivery using biodegradable poly(ester amine)s (PEAs) based on low-molecular-weight polyethylenimine and poly(epsilon-caprolactone)-pluronic-poly(epsilon-caprolactone). *J Biomed Nanotechnol*. 2010; 6: 351–9.
- Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, Aoyama K, et al. Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology*. 2010; 62: 73–82.
- Yahalom-Ronen Y, Tamir H, Melamed S, Politi B, Shifman O, Achdout H, et al. A single dose of recombinant VSV-G-spike vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge. *Nat Commun*. 2020; 11: 6402.
- Kwon M, Firestein BL. DNA transfection: calcium phosphate method. *Methods Mol Biol*. 2013; 1018: 107–10.
- Chumakov SP, Kravchenko JE, Prassolov VS, Frolova EI, Chumakov PM. Efficient downregulation of multiple mRNA targets with a single shRNA-expressing lentiviral vector. *Plasmid*. 2010;

63: 143–9.

28. Hasan MM, Ragnarsson L, Cardoso FC, Lewis RJ. Transfection methods for high-throughput cellular assays of voltage-gated calcium and sodium channels involved in pain. *PLoS One*. 2021;

16: e0243645.

29. Fang XT, Sehlin D, Lannfelt L, Syvanen S, Hultqvist G. Efficient and inexpensive transient expression of multispecific multivalent antibodies in Expi293 cells. *Biol Proced Online*. 2017; 19: 11.

References

- Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010; 397: 3173–8.
- Teixeira AP, Stucheli P, Auslander S, Auslander D, Schonenberger P, Hurlermann S, et al. CelloSelect — A synthetic cellobiose metabolic pathway for selection of stable transgenic CHO cell lines. *Metabolic Engineering*. 2022; 70: 23–30.
- Gu L, Kitamura M. Sensitive detection and monitoring of senescence-associated secretory phenotype by SASP-RAP assay. *PLoS One*. 2012; 7: e52305.
- Miura M, Yuan J. Transient transfection assay of cell death genes. *Methods in Enzymology*. 2000; 322: 480–92.
- Strebel A, Harr T, Bachmann F, Wernli M, Erb P. Green fluorescent protein as a novel tool to measure apoptosis and necrosis. *Cytometry*. 2001; 43: 126–33.
- Boulaiz H, Prados J, Melguizo C, Garcia AM, Marchal JA, Ramos JL, et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human breast cancer by transfection of gef gene. *British Journal of Cancer*. 2003; 89: 192–8.
- Vaheri A, Pagano JS. Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology*. 1965; 27: 434–6.
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 6108–13.
- Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Molecular Therapy*. 2008; 16: 698–706.
- Longo PA, Kavran JM, Kim MS, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods in Enzymology*. 2013; 529: 227–40.
- Jin L, Zeng X, Liu M, Deng Y, He N. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics*. 2014; 4: 240–55.
- Rahimi P, Mobarakeh VI, Kamalzare S, SajadianFard F, Vahabpour R, Zabiollahi R. Comparison of transfection efficiency of polymer-based and lipid-based transfection reagents. *Bratisl Lek Listy*. 2018; 119: 701–05.
- Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973; 52: 456–67.
- Orrantia E, Chang PL. Intracellular distribution of DNA internalized through calcium phosphate precipitation. *Experimental Cell Research*. 1990; 190: 170–4.
- Kingston RE, Chen CA, Okayama H. Calcium phosphate transfection. *Current protocols in immunology*. 2001; 31: 1–9.
- Olton D, Li J, Wilson ME, Rogers T, Close J, Huang L, et al. Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: influence of the synthesis parameters on transfection efficiency. *Biomaterials*. 2007; 28: 1267–79.
- Pedraza CE, Bassett DC, McKee MD, Nelea V, Gbureck U, Barralet JE. The importance of particle size and DNA condensation salt for calcium phosphate nanoparticle transfection. *Biomaterials*. 2008; 29: 3384–92.
- Sokolova VV, Radtke I, Heumann R, Eppele M. Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles. *Biomaterials*. 2006; 27: 3147–53.
- Cao X, Deng W, Wei Y, Su W, Yang Y, Wei Y, et al. Encapsulation of plasmid DNA in calcium phosphate nanoparticles: stem cell uptake and gene transfer efficiency. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6: 3335–49.
- Nouri A, Castro R, Santos JL, Fernandes C, Rodrigues J, Tomas H. Calcium phosphate-mediated gene delivery using simulated body fluid (SBF). *Int J Pharm*. 2012; 434: 199–208.
- Baker A, Saltik M, Lehrmann H, Killisch I, Mautner V, Lamm G, et al. Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive and effective reagent for condensing and linking plasmid DNA to adenovirus for gene delivery. *Gene Therapy*. 1997; 4: 773–82.
- Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szwedczyk A. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Molecular Therapy*. 2005; 11: 990–5.
- Liu T, Yu X, Kan B, Guo Q, Wang X, Shi S, et al. Enhanced gene delivery using biodegradable poly(ester amine)s (PEAs) based on low-molecular-weight polyethylenimine and poly(epsilon-caprolactone)-pluronic-poly(epsilon-caprolactone). *J Biomed Nanotechnol*. 2010; 6: 351–9.
- Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, Aoyama K, et al. Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology*. 2010; 62: 73–82.
- Yahalom-Ronen Y, Tamir H, Melamed S, Politi B, Shifman O, Achdout H, et al. A single dose of recombinant VSV-G-spike vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge. *Nat Commun*. 2020; 11: 6402.
- Kwon M, Firestein BL. DNA transfection: calcium phosphate method. *Methods Mol Biol*. 2013; 1018: 107–10.
- Chumakov SP, Kravchenko JE, Prassolov VS, Frolova EI, Chumakov PM. Efficient downregulation of multiple mRNA targets with a single shRNA-expressing lentiviral vector. *Plasmid*. 2010; 63: 143–9.
- Hasan MM, Ragnarsson L, Cardoso FC, Lewis RJ. Transfection methods for high-throughput cellular assays of voltage-gated calcium and sodium channels involved in pain. *PLoS One*. 2021; 16: e0243645.
- Fang XT, Sehlin D, Lannfelt L, Syvanen S, Hultqvist G. Efficient and inexpensive transient expression of multispecific multivalent antibodies in Expi293 cells. *Biol Proced Online*. 2017; 19: 11.

ИЗОФОРМЫ микроРНК MIR-148A И MIR-203A ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО ИГРАЮТ РОЛЬ СУПРЕССОРОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

С. А. Нерсисян^{1,2} ✉

¹ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, Армения

Изоформы микроРНК — класс коротких некодирующих РНК, осуществляющих регуляцию экспрессии генов. Изоформы микроРНК отличаются от канонических микроРНК несколькими нуклеотидами на концах молекулы, причем вариации с 5'-концов микроРНК изменяют множество генов-мишеней. Целью работы было провести анализ функциональной активности 5'-изоформ микроРНК в тканях колоректального рака. Мишени 5'-изоформ микроРНК были предсказаны с помощью биоинформатических программ miRDB и TargetScan. Полученные данные о мишенях 5'-изоформ микроРНК были интегрированы с данными секвенирования мРНК и изоформ микроРНК образцов первичных колоректальных опухолей проекта The Cancer Genome Atlas Colon Adenocarcinoma. Для построения сети взаимодействий изоформ микроРНК, их мишеней и транскрипционных факторов по интегрированным данным использовали алгоритм miRGTF-net. Показано, что высокоэкспрессированные при колоректальном раке изоформы микроРНК, различающиеся одним нуклеотидом на 5'-конце молекулы, имеют не более 30% общих мишеней. В регуляторной сети взаимодействий выявлены наиболее активные изоформы микроРНК. Уровни экспрессии канонической микроРНК hsa-miR-148a-3p и ее предсказанных мишеней, являющихся регуляторами клеточной пролиферации (*CSF1*, *ETS1*, *FLT1*, *ITGA5*, *MEIS1*, *MITF*, *RUNX2*), были значимо отрицательно коррелированы, откуда может следовать противоопухолевая роль данной молекулы. Каноническая микроРНК hsa-miR-203a-3p и ее 5'-изоформа были антикоррелированы с различными генами-мишенями, но при этом обе потенциально подавляли экспрессию генов, вовлеченных в эпителиально-мезенхимный переход: *SNAIL2* и *TNC*.

Ключевые слова: изоформы микроРНК, колоректальный рак, регуляторные сети, miRGTF-net, TCGA

Финансирование: исследование осуществлено в рамках Программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ.

Благодарности: Алексею Галатенко из лаборатории молекулярной физиологии НИУ ВШЭ за критику авторских идей и ценные замечания.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено с соблюдением этических принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ **Для корреспонденции:** Степан Ашотович Нерсисян
ул. Вавилова, д. 7, г. Москва, 117312, Россия; snersisyan@hse.ru

Статья получена: 29.04.2022 **Статья принята к печати:** 22.05.2022 **Опубликована онлайн:** 30.05.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.028

ISOFORMS OF MIR-148A AND MIR-203A ARE PUTATIVE SUPPRESSORS OF COLORECTAL CANCER

Nersisyan SA^{1,2} ✉

¹ National Research University Higher School of Economics (HSE), Moscow, Russia

² Institute of Molecular Biology (IMB) of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, Yerevan, Armenia

MicroRNAs are short non-coding molecules which regulate translation in a gene-specific manner. MicroRNA isoforms that differ by few extra or missing nucleotides at the 5'-terminus (5'-isomiR) show strikingly different target specificity. This study aimed to identify functional roles of 5'-isomiR in colorectal cancers. Transcriptomic targets of microRNA isoforms were predicted using bioinformatics tools miRDB and TargetScan. The sets of putative targets identified for 5'-isomiR were integrated with mRNA and microRNA sequencing data for primary colorectal tumors retrieved from The Cancer Genome Atlas Colon Adenocarcinoma (TCGA-COAD) database. The network of interactions among miRNA, their targets and transcription factors was built using the miRGTF-net algorithm. The results indicate that microRNA isoforms highly expressed in colorectal cancer and differing by a single nucleotide position at the 5'-terminus have ≤ 30% common targets. The regulatory network of interactions enables identification of the most engaged microRNA isoforms. Anti-correlated expression levels of canonical microRNA hsa-miR-148a-3p and its putative targets including *CSF1*, *ETS1*, *FLT1*, *ITGA5*, *MEIS1*, *MITF* and *RUNX2* proliferation regulators suggest an anti-tumor role for this molecule. The canonical microRNA hsa-miR-203a-3p and its 5'-isoform bind different sets of anti-correlated putative targets, although both of them interact with genes involved in the epithelial-mesenchymal transition: *SNAIL2* and *TNC*.

Keywords: isomiR, colorectal cancer, regulatory networks, miRGTF-net, TCGA

Funding: the study was supported by HSE Basic Research Program.

Acknowledgement: the author thanks Aleksey Galatenko of the HSE Laboratory of Molecular Physiology for the fruitful critique and valuable comments.

Compliance with ethical standards: the study complies with the ethical principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Stepan A. Nersisyan
Vavilova, 7, Moscow, 117312, Russia; snersisyan@hse.ru

Received: 29.04.2022 **Accepted:** 22.05.2022 **Published online:** 30.05.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.028

МикроРНК — семейство коротких некодирующих РНК, осуществляющих пост-транскрипционную регуляцию экспрессии генов [1]. Необходимым условием для связывания микроРНК с мРНК является комплементарность seed-региона микроРНК (2-7 нуклеотиды с 5'-конца) с последовательностью мРНК-мишени [2]. В результате такого связывания происходит остановка трансляции мРНК или же ее деградация, причем вероятность деградации

напрямую связана с количеством комплементарных связей за пределами seed-региона [2]. Хорошо известно, что молекулы микроРНК могут играть роль как опухолевых супрессоров, так и онкогенов для множества видов рака [3–5].

В ходе созревания микроРНК ферменты Drosha и Dicer могут неточно осуществлять обрезку шпильки примикроРНК, в результате чего образуются изоформы

микроРНК, отличающиеся от канонической микроРНК несколькими нуклеотидами на концах молекулы [6]. Вариация длины микроРНК с 5'-конца играет особую роль, так как при изменениях смещается seed-регион; таким образом, 5'-изоформы микроРНК обладают другим набором мишеней даже в случае изменения длины на один нуклеотид.

Колоректальный рак (КРР) занимает третье место по частоте заболеваемости и второе по частоте летальных исходов среди онкологических заболеваний в мире [7]. Широко известны примеры участия микроРНК в механизмах прогрессии и метастазирования КРР. Например, семейство микроРНК miR-200 подавляет экспрессию генов *ZEB1*, *ZEB2*, кодирующих ключевые транскрипционные факторы (ТФ) для эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМП) [8]. Соответственно, транскрипционное и/или эпигенетическое подавление экспрессии miR-200 способствует ЭМП и метастазированию рака [8]. Профили экспрессии молекул микроРНК активно используют также для поиска диагностических и прогностических маркеров КРР [9]. На сегодняшний день изучение роли изоформ микроРНК при КРР ограничено изучением их уровней экспрессии в опухолевых и здоровых тканях [10], при этом, насколько нам известно, функциональную активность 5'-изоформ микроРНК при КРР исследователи не анализировали.

Большое количество микроРНК и на порядок большее число порождаемых ими регуляторных взаимодействий (в среднем для одной микроРНК предсказано около 200 мишеней [1]) требуют применения биоинформатических подходов; один из наиболее распространенных методов — анализ регуляторных сетей. В рамках данного подхода молекулам микроРНК и генам ставят в соответствие вершины сети, а паре взаимодействующих молекул — ребро, соединяющее микроРНК и мишень [11]. Для построения регуляторных сетей традиционно используют два подхода: литературные базы данных взаимодействий и корреляционный анализ по выборке образцов с известной экспрессией мРНК и микроРНК. Нами ранее был разработан и программно реализован алгоритм miRGTF-net, позволяющий объединить эти два подхода и добавить в сеть другой класс регуляторных молекул — транскрипционных факторов [12]. Использование данного алгоритма позволяет максимально полно и достоверно описать ландшафт внутриклеточных взаимодействий в интересующем типе клеток/тканей.

Целью работы было выяснить функциональную роль 5'-изоформ микроРНК в тканях КРР, проанализировав их профиль экспрессии, предсказав мишени на основе нуклеотидных последовательностей и интегрировав полученные данные с данными активности ТФ с помощью алгоритма miRGTF-net.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Предсказание мишеней изоформ микроРНК

Последовательности шпилек при-микроРНК и канонические позиции их разрезания ферментами Droscha и Dicer извлекали из базы данных miRBase версии 21 (<https://www.mirbase.org>). Для обозначения 5'-изоформ микроРНК использовали стандартную номенклатуру: число после вертикальной черты обозначает сдвиг позиции разрезания относительно канонического в направлении от 5'- к 3'-концу. Например, hsa-miR-10a-5p|+1 соответствует последовательности микроРНК hsa-miR-10a-5p без первого нуклеотида на 5'-конце молекулы.

Нуклеотидные последовательности микроРНК и их изоформ вводили в программы miRDB версии 6.0 [13] и TargetScan версии 7.2 [2] для определения мРНК-мишеней. Согласно рекомендациям разработчиком miRDB, выбирали предсказания с качеством связывания не менее 80. Число предсказаний TargetScan уравнивали с числом предсказаний miRDB, выбирая соответствующее число наиболее сильных взаимодействий для каждой изоформ микроРНК.

Сбор и анализ данных секвенирования мРНК и изоформ микроРНК

Публично доступные исходные данные секвенирования мРНК и изоформ микроРНК проекта The Cancer Genome Atlas Colon Adenocarcinoma (TCGA-COAD) получали с портала GDC (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Данные нормировали с помощью пакета edgeR версии 3.30.0 [14], использовали алгоритм нормализации Trimmed Mean of M-values (TMM), в результате получили таблицы Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads (TMM-RPKM) для экспрессии мРНК и Reads Per Million mapped reads (TMM-RPM) — для экспрессии микроРНК.

Таблицу экспрессии 5'-изоформ микроРНК сортировали по суммарной экспрессии в рассматриваемых образцах, после чего считали кумулятивную функцию распределения. Наименьшее число 5'-изоформ микроРНК, покрывающих 95% всех прочтений секвенирования, обозначали высокоэкспрессированными 5'-изоформами микроРНК и использовали для дальнейшего анализа.

Построение регуляторной сети взаимодействий изоформ микроРНК, их мишеней и транскрипционных факторов

Алгоритм miRGTF-net [12] использовали для построения регуляторной сети взаимодействий изоформ микроРНК, их мишеней и транскрипционных факторов. Основным преимуществом алгоритма является возможность интеграции данных экспрессии мРНК и изоформ микроРНК (TCGA-COAD) с биологическими базами данных:

- TRRUST версии 2 (<https://www.grnpedia.org/trrust/>): взаимодействия ТФ и генов;
- TransmiR версии 2 (<http://www.cuilab.cn/transmir>): взаимодействия ТФ и микроРНК;
- miRDB, TargetScan: взаимодействия 5'-изоформ микроРНК и их мишеней (см. выше);
- miRIAD (<https://www.miriad-database.org>): коэкспрессия генов-хозяев и их интронных микроРНК.

Использовали каноническую последовательность шагов алгоритма miRGTF-net. Вкратце, сначала строили сеть на основе взаимодействий из баз данных. Затем для каждого ребра рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена по соответствующим значениям экспрессии TCGA-COAD. Ребра, соответствующие молекулам со слабо коррелированными уровнями экспрессии, удаляли (отсечку на абсолютное значение корреляции Спирмена выбирали по 0,9-квантили распределения корреляций). Кроме того, удаляли ребра, соединяющие положительно коррелированные изоформы микроРНК и их мишени и соединяющие отрицательно коррелированных генов-хозяев с их интронными микроРНК.

Далее оценивали силу линейной зависимости между экспрессией каждой вершины и ее прямыми регуляторами. Соответствующие линейные модели строили с помощью

гребневой регрессии. Качество моделей оценивали с помощью коэффициента детерминации R^2 , силу и направление регуляции оценивали с помощью стандартизованных β -коэффициентов регрессии. Для фильтрации вершин и ребер сети использовали пороговые значения, установленные в пакете miRGTF-net по умолчанию: модуль β -коэффициента не менее 0,3, 90% наибольших значений коэффициентов детерминации. Таким образом, полученная сеть содержала вершины, соответствующие как регуляторам экспрессии, так и регулируемым генам и изоформам микроРНК.

Поиск сильно связанных компонент в сети проводили с помощью пакета NetworkX версии 2.8 (<https://networkx.org>). Регуляторные сети визуализировали с помощью программ Gephi (<https://gephi.org>) и yED Graph Editor (yWorks GmbH; Германия).

Анализ обогащения по функциональной принадлежности

Для функциональной аннотации списков генов (мишеней 5'-изоформ микроРНК) использовали веб-сервис DAVID версии декабря 2021 г. [15] и аннотацию биологических путей Gene Ontology (GO) [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Профиль экспрессии изоформ микроРНК в образцах колоректального рака

Анализируемая выборка TCGA-COAD состояла из профилей экспрессии мРНК и 5'-изоформ микроРНК 426 образцов первичных опухолей КРР. Нами было выделено 55 высокоэкспрессированных изоформ микроРНК, 10 из которых составляли неканонические изоформы микроРНК (рис. 1). Были выявлены две неканонические 5'-изоформы микроРНК, на каждую из которых приходилось более 1% от тотальной экспрессии

микроРНК в рассматриваемых образцах: hsa-miR-192-5p|+1 (2,4%) и hsa-miR-10a-5p|+1 (1,3%).

Вариация последовательности микроРНК на ее 5'-конце меняет seed-регион молекулы, вследствие чего может меняться множество потенциальных генов-мишеней. Последовательности найденных канонических и неканонических изоформ микроРНК были использованы для биоинформатического предсказания их мишеней. Как и ожидалось, пары изоформ микроРНК, отличающихся на один нуклеотид с 5'-конца, имели слабо пересекающиеся множества мишеней (см. таблицу). Например, каноническая форма микроРНК hsa-miR-10a-5p и ее 5'-изоформа без первого нуклеотида имели всего 11 общих мишеней из 267 мишеней в объединении (4,1%). Максимальная доля общих мишеней была достигнута для микроРНК hsa-miR-29a-3p и ее более длинной изоформы: 246 общих мишеней, 788 мишеней в объединении (31,2%).

Регуляторная сеть взаимодействий изоформ микроРНК, их мишеней и транскрипционных факторов

Следующим шагом биоинформатического анализа было построение регуляторной сети взаимодействий в клетках КРР. Алгоритм miRGTF-net позволяет строить такие сети, интегрируя два типа данных: биологически обоснованные взаимодействия из баз данных и профили экспрессии мРНК и изоформ микроРНК в выборке образцов. Регуляторная сеть содержала взаимодействия четырех типов:

- ТФ, регулирующие экспрессию генов;
- ТФ, регулирующие экспрессию микроРНК;
- 5'-изоформы микроРНК, регулирующие экспрессию генов;
- коэкспрессию генов-хозяев и их интронных микроРНК.

Данные экспрессии мРНК и 5'-изоформ микроРНК в выборке TCGA-COAD использовали для выбора взаимодействий, подкрепленных значимой корреляцией в рассматриваемых образцах.

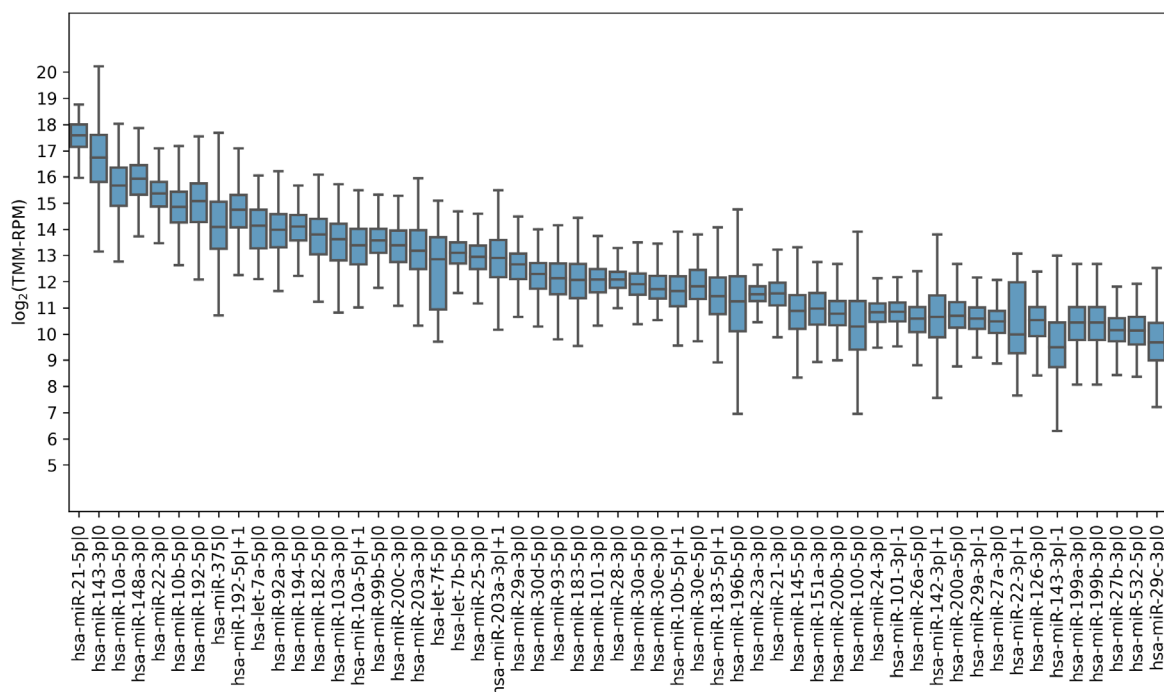


Рис. 1. Распределение экспрессии 55 наиболее экспрессированных 5'-изоформ микроРНК в выборке образцов колоректального рака. Горизонтальный отрезок внутри ящика отображает медиану распределения, границы ящиков соответствуют нижнему и верхнему квартилям, а вертикальные отрезки за пределами ящика продолжают до минимального и максимального значения экспрессии

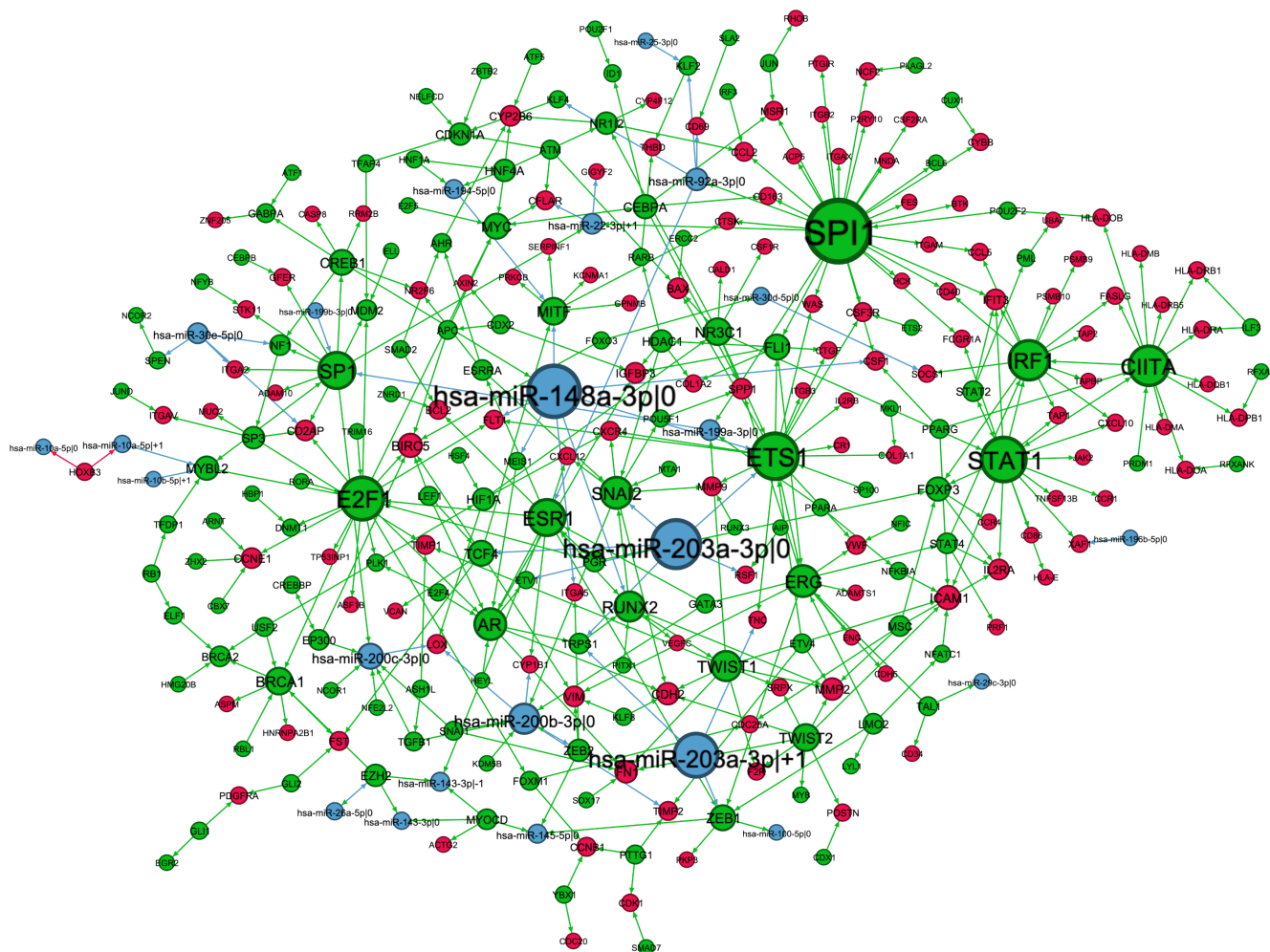


Рис. 2. Регуляторная сеть взаимодействий изоформ микроРНК, их мишеней и транскрипционных факторов. Синим, зеленым и красным цветом выделены 5'-изоформы микроРНК, транскрипционные факторы и гены, соответственно. Цвета ребер соответствуют цветам соответствующих регуляторов. Размеры вершин линейно соответствуют их степеням

Построенная сеть состояла из 333 молекул: 24 5'-изоформы микроРНК, 166 ТФ и 143 гена, не кодирующих ТФ (рис. 2). Из 456 взаимодействий 42 соответствовали подавлению экспрессии генов-мишеней изоформами микроРНК, 413 регуляции экспрессии генов и микроРНК с помощью ТФ и лишь одна пара ген-микроРНК соответствовала коэкспрессии генохозяина и интронной микроРНК: *HOXB3* и *hsa-mir-10a*.

Наибольшее число антикоррелированных мишеней (семь) было найдено для канонической микроРНК hsa-miR-148a-3p. Данный список состоял из известных онкогенов, включая регуляторы и маркеры пролиферации (*CSF1*, *ETS1*, *FLT1*, *MEIS1*, *MITF*, *RUNX2*, категория GO:0008284 “positive regulation of cell proliferation”) и молекулу из семейства интегринов ITGA5, участвующую в регуляции клеточной пролиферации, инвазии и миграции путем передачи сигнала в клетки [17]. Данная микроРНК тоже присутствовала в наибольшей компоненте сильной связности регуляторной сети (т. е. подсети, в которой существует ориентированный путь между двумя любыми вершинами), напрямую связанной с ЭМП и эстрогеновым сигнальным путем (рис. 3). Таким образом, микроРНК hsa-miR-148a-3p потенциально подавляет экспрессию проопухолевых генов, играя роль возможного опухолевого супрессора при КРП.

Второй по количеству регулируемых генов оказалась пара, состоящая из канонической микроРНК hsa-miR-203a-3p|0

и ее 5'-изоформы hsa-miR-203a-3p|+1. В то время как у данных молекул не было общих антикоррелированных мишеней, обе изоформы микроРНК выполняли единую функцию, потенциально подавляя экспрессию онкогенов. Так, экспрессия канонической микроРНК hsa-miR-203a-3p|0 отрицательно коррелировала с экспрессией ТФ *SNAI2*, являющегося одним из драйверов ЭМП [18], а неканоническая 5'-изоформа hsa-miR-203a-3p|+1 предположительно регулировала экспрессию белка внеклеточного матрикса, кодируемого геном *TNC*, который также играет ключевую роль в ЭМП при КРР [19].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании с помощью биоинформатического анализа была рассмотрена функциональная активность 5'-изоформ микроРНК в злокачественных колоректальных опухолях. Показано, что изоформы микроРНК, отличающиеся одним нуклеотидом на 5'-конце молекулы, обладают слабо пересекающимися множествами генов-мишеней (31,2% максимум). В число наиболее активных регуляторов вошли hsa-miR-148a-3p (каноническая микроРНК), hsa-miR-203a-3p|0 (каноническая микроРНК) и ее 5'-изоформа hsa-miR-203a-3p|+1. Интересно, что все три найденные микроРНК предположительно подавляли экспрессию проопухолевых генов, причем множества

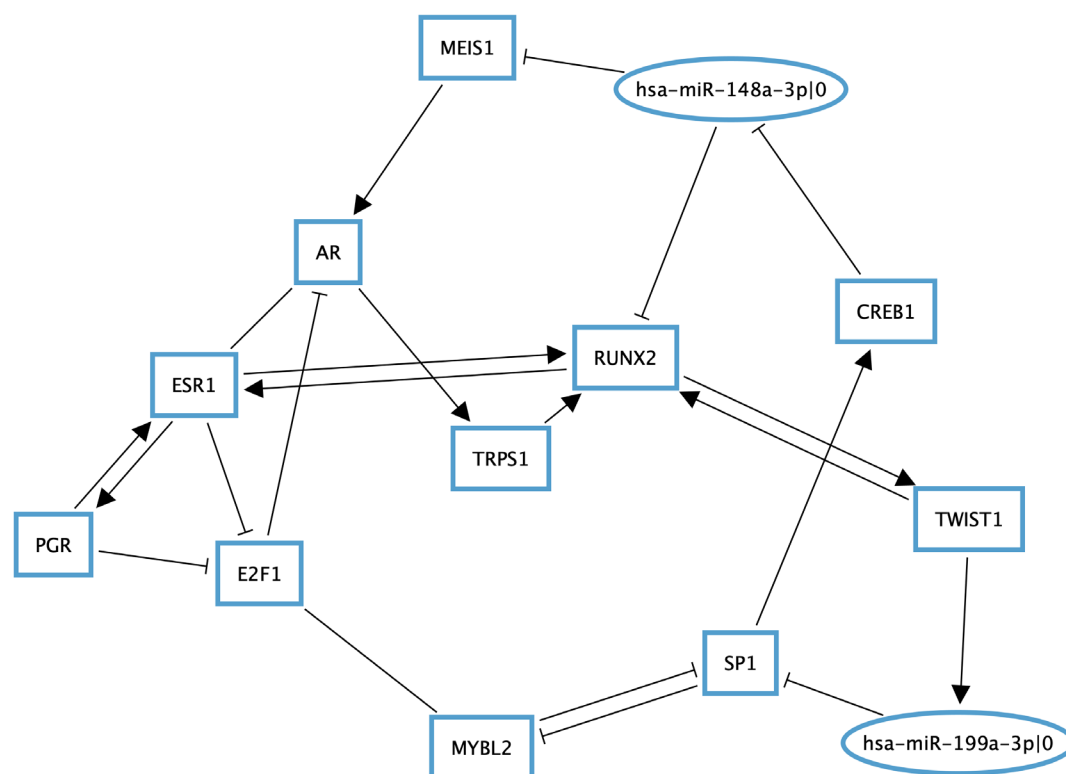


Рис. 3. Сильно связанная подсеть взаимодействий 5'-изоформ микроРНК и транскрипционных факторов. Эллипсами и прямоугольниками обозначены изоформы микроРНК и транскрипционные факторы соответственно. Стрелки обозначают активацию экспрессии, Т-образные линии обозначают подавление экспрессии

антикоррелированных мишеней канонической формы и 5'-изоформы miR-203a не пересекались.

Функциональную активность 5'-изоформ микроРНК ранее изучали в контексте рака молочной железы. Показано, что две 5'-изоформы микроРНК hsa-miR-183-5p оказывают различное влияние на транскриптом клеток MDA-MB-231, в частности, были найдены гены, опосредованно регулируемые изоформами в разных направлениях (*EGFR*, *NRAS*) [20]. По нашим данным, анализ мишени 5'-изоформ микроРНК при KPP проведен впервые.

Четыре из семи отобранных нами потенциальных мишеней hsa-miR-148a-3p были валидированы *in vitro* в ранее опубликованных исследованиях: *CSF1*, *ITGA5* [21], *MITF* [22], *RUNX2* [23]. Нами ранее было также обнаружено, что гипоксия клеточных линий KPP HT-29 и Caco-2 приводила к подавлению экспрессии микроРНК hsa-miR-148a-3p, что влекло за собой повышение экспрессии гена-мишени *ITGA5* [24]. В ряде других работ показано,

что miR-148a оказывает проапоптотическое действие и ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию клеток KPP, подавляя экспрессию *Bcl-2* [25], *ErbB3* [26] и *WNT10b* [27]. Помимо KPP, роль hsa-miR-148a-3p в качестве супрессора пролиферации опухолевых клеток была показана в контексте раков молочной железы, простаты и уротелия [28]. Таким образом, полученные нами данные о противоопухолевой роли miR-148a хорошо согласуются с существующей литературой.

Аналогичную картину можно наблюдать для канонической формы микроРНК miR-203a: предсказанное нами взаимодействие miR-203a и *SNAI2* было ранее валидировано *in vitro* [29], оверэкспрессия miR-203a в клеточных линиях KPP приводила к ингибированию инвазии и миграции клеток [30]. Таким образом, выявленные нами потенциальные мишени неканонической изоформы микроРНК hsa-miR-203a-3p|+1 согласуются с известными фактами о функциональной активности канонической микроРНК.

Таблица. Число предсказанных мишеней высокоэкспрессированных канонических микроРНК и соответствующих 5'-изоформ

Каноническая микроРНК	5'-изоформа	Каноническая микроРНК, число мишеней	5'-изоформа, число мишеней	Число общих мишеней
hsa-miR-10a-5p 0	hsa-miR-10a-5p +1	175	103	11
hsa-miR-10b-5p 0	hsa-miR-10b-5p +1	173	102	12
hsa-miR-22-3p 0	hsa-miR-22-3p +1	235	235	42
hsa-miR-29a-3p 0	hsa-miR-29a-3p -1	671	363	246
hsa-miR-101-3p 0	hsa-miR-101-3p -1	632	694	267
hsa-miR-142-3p 0	hsa-miR-142-3p +1	254	359	33
hsa-miR-143-3p 0	hsa-miR-143-3p -1	351	205	118
hsa-miR-183-5p 0	hsa-miR-183-5p +1	366	396	63
hsa-miR-192-5p 0	hsa-miR-192-5p +1	68	76	16
hsa-miR-203a-3p 0	hsa-miR-203a-3p +1	573	676	256

ВЫВОДЫ

Применение методов построения и анализа регуляторных сетей взаимодействий позволило нам определить роль функциональной активности некоторых 5'-изоформ микроРНК в клетках колоректального рака. Показано, что 5'-изоформы микроРНК hsa-miR-203a-3p могут

регулировать различные гены-мишени, играя при этом схожую антиопухолевую роль. Дальнейшие экспериментальные исследования, например, сверхэкспрессия 5'-изоформ hsa-miR-203a-3p и других микроРНК *in vitro* и *in vivo*, необходимы для понимания молекулярных механизмов развития и прогрессирования колоректальных опухолей.

Литература

- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120 (1): 15–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652477>.
- Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015; 4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26267216>.
- Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med*. 2009; 60 (1): 167–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630570>.
- Nersisyan S, Shkurnikov M, Poloznikov A, Turchinovich A, Burwinkel B, Anisimov N, et al. Post-Processing Algorithm for miRNA Microarray Data. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32059403>.
- Turchinovich A, Tonevitsky AG, Cho WC, Burwinkel B. Check and mate to exosomal extracellular miRNA: new lesson from a new approach. *Front Mol Biosci*. 2015; 2 (APR): 11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988178>.
- Zhiyanov A, Nersisyan S, Tonevitsky A. Hairpin sequence and structure is associated with features of isomiR biogenesis. *RNA Biol*. 2021; 18 (sup1): 430–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34286662>.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71 (3): 209–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33538338>.
- Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer*. 2013; 132 (4): 745–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753312>.
- Chen B, Xia Z, Deng Y-N, Yang Y, Zhang P, Zhu H, et al. Emerging microRNA biomarkers for colorectal cancer diagnosis and prognosis. *Open Biol*. 2019; 9 (1): 180212. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30958116>.
- Zelli V, Compagnoni C, Capelli R, Corrente A, Comice J, Vecchiotti D, et al. Emerging Role of isomiRs in Cancer: State of the Art and Recent Advances. *Genes (Basel)*. 2021; 12 (9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34573429>.
- Galatenko VV, Galatenko AV, Samatov TR, Turchinovich AA, Shkurnikov MY, Makarova JA, et al. Comprehensive network of miRNA-induced intergenic interactions and a biological role of its core in cancer. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 2418. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29402894>.
- Nersisyan S, Galatenko A, Galatenko V, Shkurnikov M, Tonevitsky A. miRGTF-net: Integrative miRNA-gene-TF network analysis reveals key drivers of breast cancer recurrence. *PLoS One*. 2021; 16 (4): e0249424. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33852600>.
- Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res*. 2020; 48 (D1): D127–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31504780>.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010; 26 (1): 139–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910308>.
- Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res*. 2022. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35325185>.
- Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Res*. 2021; 49 (D1): D325–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33290552>.
- Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2018; 18 (9): 533–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30002479>.
- Dudas J, Ladanyi A, Ingruber J, Steinbichler TB, Riechelmann H. Epithelial to Mesenchymal Transition: A Mechanism that Fuels Cancer Radio/Chemoresistance. *Cells*. 2020; 9 (2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32059478>.
- Takahashi Y, Sawada G, Kurashige J, Matsumura T, Uchi R, Ueo H, et al. Tumor-derived tenascin-C promotes the epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Anticancer Res*. 2013; 33 (5): 1927–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645740>.
- Telonis AG, Lohrer P, Jing Y, Londin E, Rigoutsos I. Beyond the one-locus-one-miRNA paradigm: microRNA isoforms enable deeper insights into breast cancer heterogeneity. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43 (19): 9158–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26400174>.
- Cimino D, De Pittà C, Orso F, Zampini M, Casara S, Penna E, et al. miR148b is a major coordinator of breast cancer progression in a relapse-associated microRNA signature by targeting ITGA5, ROCK1, PIK3CA, NRAS, and CSF1. *FASEB J*. 2013; 27 (3): 1223–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233531>.
- Hafidóttir BS, Bergsteinsdóttir K, Praetorius C, Steingrímsson E. miR-148 regulates Mitf in melanoma cells. *PLoS One*. 2010; 5 (7): e11574. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644734>.
- Liu H, Su H, Wang X, Hao W. MiR-148a regulates bone marrow mesenchymal stem cells-mediated fracture healing by targeting insulin-like growth factor 1. *J Cell Biochem*. 2018. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30335895>.
- Nersisyan S, Galatenko A, Chekova M, Tonevitsky A. Hypoxia-Induced miR-148a Downregulation Contributes to Poor Survival in Colorectal Cancer. *Front Genet*. 2021; 12: 662468. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34135940>.
- Zhang H, Li Y, Huang Q, Ren X, Hu H, Sheng H, et al. MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. *Cell Death Differ*. 2011; 18 (11): 1702–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21455217>.
- Zhao W, Zheng J, Wei G, Yang K, Wang G, Sun X. miR-148a inhibits cell proliferation and migration through targeting ErbB3 in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2019; 18 (3): 2530–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31402949>.
- Shi L, Xi J, Xu X, Peng B, Zhang B. MiR-148a suppressed cell invasion and migration via targeting WNT10b and modulating β -catenin signaling in cisplatin-resistant colorectal cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2019; 109: 902–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30551544>.
- Li Y, Deng X, Zeng X, Peng X. The Role of Mir-148a in Cancer. *J Cancer*. 2016; 7 (10): 1233–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27390598>.
- Ma X, Li L, Jia T, Chen M, Liu G, Li C, et al. miR-203a controls keratinocyte proliferation and differentiation via targeting the

stemness-associated factor Δ Np63 and establishing a regulatory circuit with SNAI2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 491 (2): 241–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28754589>.

References

- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120 (1): 15–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652477>.
- Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015; 4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26267216>.
- Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med*. 2009; 60 (1): 167–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630570>.
- Nersisyan S, Shkurnikov M, Poloznikov A, Turchinovich A, Burwinkel B, Anisimov N, et al. Post-Processing Algorithm for miRNA Microarray Data. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32059403>.
- Turchinovich A, Tonevitsky AG, Cho WC, Burwinkel B. Check and mate to exosomal extracellular miRNA: new lesson from a new approach. *Front Mol Biosci*. 2015; 2 (APR): 11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988178>.
- Zhiyanov A, Nersisyan S, Tonevitsky A. Hairpin sequence and structure is associated with features of isomiR biogenesis. *RNA Biol*. 2021; 18 (sup1): 430–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34286662>.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71 (3): 209–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33538338>.
- Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer*. 2013; 132 (4): 745–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753312>.
- Chen B, Xia Z, Deng Y-N, Yang Y, Zhang P, Zhu H, et al. Emerging microRNA biomarkers for colorectal cancer diagnosis and prognosis. *Open Biol*. 2019; 9 (1): 180212. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30958116>.
- Zelli V, Compagnoni C, Capelli R, Corrente A, Cornice J, Vecchiotti D, et al. Emerging Role of isomiRs in Cancer: State of the Art and Recent Advances. *Genes (Basel)*. 2021; 12 (9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34573429>.
- Galatenko VV, Galatenko AV, Samatov TR, Turchinovich AA, Shkurnikov MY, Makarova JA, et al. Comprehensive network of miRNA-induced intergenic interactions and a biological role of its core in cancer. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 2418. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29402894>.
- Nersisyan S, Galatenko A, Galatenko V, Shkurnikov M, Tonevitsky A. miRGTF-net: Integrative miRNA-gene-TF network analysis reveals key drivers of breast cancer recurrence. *PLoS One*. 2021; 16 (4): e0249424. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33852600>.
- Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res*. 2020; 48 (D1): D127–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31504780>.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010; 26 (1): 139–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910308>.
- Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res*. 2022. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35325185>.
- Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Res*. 2021; 49 (D1): D325–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33290552>.
- Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2018; 18 (9): 533–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30002479>.
- Dudas J, Ladanyi A, Ingruber J, Steinbichler TB, Riecheltmann H. Epithelial to Mesenchymal Transition: A Mechanism that Fuels Cancer Radio/Chemoresistance. *Cells*. 2020; 9 (2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32059478>.
- Takahashi Y, Sawada G, Kurashige J, Matsumura T, Uchi R, Ueo H, et al. Tumor-derived tenascin-C promotes the epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Anticancer Res*. 2013; 33 (5): 1927–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645740>.
- Telonis AG, Lohrer P, Jing Y, Londin E, Rigoutsos I. Beyond the one-locus-one-miRNA paradigm: microRNA isoforms enable deeper insights into breast cancer heterogeneity. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43 (19): 9158–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26400174>.
- Cimino D, De Pittà C, Orso F, Zampini M, Casara S, Penna E, et al. miR148b is a major coordinator of breast cancer progression in a relapse-associated microRNA signature by targeting ITGA5, ROCK1, PIK3CA, NRAS, and CSF1. *FASEB J*. 2013; 27 (3): 1223–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233531>.
- Hafliadóttir BS, Bergsteinsdóttir K, Praetorius C, Steingrímsson E. miR-148 regulates Mitf in melanoma cells. *PLoS One*. 2010; 5 (7): e11574. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644734>.
- Liu H, Su H, Wang X, Hao W. MiR-148a regulates bone marrow mesenchymal stem cells-mediated fracture healing by targeting insulin-like growth factor 1. *J Cell Biochem*. 2018. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30335895>.
- Nersisyan S, Galatenko A, Chekova M, Tonevitsky A. Hypoxia-Induced miR-148a Downregulation Contributes to Poor Survival in Colorectal Cancer. *Front Genet*. 2021; 12: 662468. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34135940>.
- Zhang H, Li Y, Huang Q, Ren X, Hu H, Sheng H, et al. MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. *Cell Death Differ*. 2011; 18 (11): 1702–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21455217>.
- Zhao W, Zheng J, Wei G, Yang K, Wang G, Sun X. miR-148a inhibits cell proliferation and migration through targeting ErbB3 in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2019; 18 (3): 2530–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31402949>.
- Shi L, Xi J, Xu X, Peng B, Zhang B. MiR-148a suppressed cell invasion and migration via targeting WNT10b and modulating β -catenin signaling in cisplatin-resistant colorectal cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2019; 109: 902–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30551544>.
- Li Y, Deng X, Zeng X, Peng X. The Role of Mir-148a in Cancer. *J Cancer*. 2016; 7 (10): 1233–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27390598>.
- Ma X, Li L, Jia T, Chen M, Liu G, Li C, et al. miR-203a controls keratinocyte proliferation and differentiation via targeting the stemness-associated factor Δ Np63 and establishing a regulatory circuit with SNAI2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 491 (2): 241–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28754589>.
- Qian Z, Gong L, Mou Y, Han Y, Zheng S. MicroRNA-203a-3p is a candidate tumor suppressor that targets thrombospondin 2 in colorectal carcinoma. *Oncol Rep*. 2019; 42 (5): 1825–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31545460>.

ВЛИЯНИЕ СУБИНГИБИРУЮЩИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ G4-СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ЛИГАНДОВ НА ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПРОФИЛЬ *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*

М. В. Зайчикова, Д. А. Беспятых, М. В. Малахова, И. Н. Бодоев, Т. С. Ведехина, В. А. Веселовский, К. М. Климина, А. М. Варижук, Е. А. Шитиков 

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

В связи с широким распространением лекарственной устойчивости у *Mycobacterium tuberculosis* особое значение приобретает поиск противотуберкулезных препаратов с принципиально новым механизмом действия, исключающим развитие перекрестной устойчивости. В этом отношении определенный интерес представляют G-квадруплексы (G4) — неканонические структуры ДНК, участвующие в регуляции и поддержании стабильности генома. Показано, что G4-стабилизирующие соединения, лиганды, оказывают ингибирующий эффект на рост микроорганизма, но точный механизм их действия неизвестен. Целью исследования было выявить связь между наличием потенциальных G4 в геноме модельного микроорганизма *M. smegmatis* mc2 155 и изменением транскриптомного профиля под действием субингибирующих концентраций лигандов BRACO-19 и TMPyP4, а также провести сравнительный анализ результатов с данными, полученными нами ранее для ингибирующих концентраций указанных лигандов. Под действием BRACO-19 было идентифицировано 589 (316↑; 273↓) и 865 (555↑; 310↓) дифференциально экспрессированных генов, для 5 и 10 мкМ соответственно. Напротив, в случае с TMPyP4 обнаружено снижение числа дифференциально экспрессированных генов с 754 (337↑; 417↓) до 702 (359↑; 343↓) для концентраций 2 и 4 мкМ соответственно. Статистический анализ не выявил связи между изменением уровня экспрессии генов под действием лигандов и наличием потенциальных квадруплекс-формирующих последовательностей, вне зависимости от локализации G4. Тем не менее было установлено, что TMPyP4 вызывает значительные изменения в экспрессии факторов транскрипции и генах биосинтеза аргинина, а BRACO-19 — в генах метаболизма железа, а также в генах систем репликации и репарации.

Ключевые слова: G-квадруплексы, транскриптомный анализ, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, BRACO-19, TMPyP4, антимикробная терапия

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №19-75-10109).

Вклад авторов: М. В. Зайчикова — анализ литературы, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; Д. А. Беспятых — анализ литературы, анализ данных, подготовка черновика рукописи; М. В. Малахова — планирование и проведение исследования; И. Н. Бодоев — анализ литературы, анализ данных, подготовка черновика рукописи; Т. С. Ведехина — проведение исследования, интерпретация данных; В. А. Веселовский — проведение исследования, анализ данных; К. М. Климина — проведение исследования, анализ и интерпретация данных; А. М. Варижук — планирование и проведение исследования, интерпретация данных; Е. А. Шитиков — планирование исследования, анализ литературы, анализ данных, подготовка черновика рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Егор Александрович Шитиков
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435, Россия; eshitikov@mail.ru

Статья получена: 08.04.2022 **Статья принята к печати:** 30.04.2022 **Опубликована онлайн:** 15.05.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.024

TRANSCRIPTIONAL PROFILING OF *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* EXPOSED TO SUBINHIBITORY CONCENTRATIONS OF G4-STABILIZING LIGANDS

Zaychikova MV, Bespiatykh DA, Malakhova MV, Bodoev IN, Vedekhina TS, Veselovsky VA, Klimina KM, Varizhuk AM, Shitikov EA 

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

The spread of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance accentuates the demand for anti-tuberculosis drugs with a fundamentally new mechanism of action without conferring cross-resistance. G-quadruplexes (G4, non-canonical DNA structures) are plausible new drug targets. Although G4-stabilizing ligands have been shown to inhibit mycobacterial growth, the exact mechanism of their action is uncertain. The aim of this study was to assess a possible correlation between putative G4 elements in a model mycobacterial strain *M. smegmatis* MC2155 and transcriptomic changes under the action of subinhibitory concentrations of G4 ligands BRACO-19 and TMPyP4. We also planned to compare the results with corresponding data previously obtained by us using higher, inhibitory concentrations of these ligands. For BRACO-19, we identified 589 (316↑; 273↓) and 865 (555↑; 310↓) differentially expressed genes at 5 μM and 10 μM, respectively. For TMPyP4, we observed the opposite trend, the number of differentially expressed genes decreased at higher concentration of the ligand: 754 (337↑; 417↓) and 702 (359↑; 343↓) for 2 μM and 4 μM, respectively. Statistical analysis revealed no correlation between ligand-induced transcriptomic changes and genomic localization of the putative quadruplex-forming sequences. At the same time, the data indicate certain functional specificity of the ligand-mediated transcriptomic effects, with TMPyP4 significantly affecting expression levels of transcription factors and arginine biosynthesis genes and BRACO-19 significantly affecting expression levels of iron metabolism and replication and reparation system genes.

Keywords: G-quadruplexes, transcriptomic analysis, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, BRACO-19, TMPyP4, antimicrobial therapy

Funding: the study was funded by the Russian Science Foundation, project number 19-75-10109

Author contribution: Zaychikova MV — literature analysis, data analysis and interpretation, manuscript drafting; Bespiatykh DA — literature analysis, data analysis, manuscript drafting; Malakhova MV — research planning and implementation; Bodoev IN — literature analysis, data analysis, manuscript drafting; Vedekhina TS — research implementation, data interpretation; Veselovsky VA — research implementation, data analysis; Klimina KM — research implementation, data analysis and interpretation; Varizhuk AM — research planning and implementation, data interpretation; Shitikov EA — research planning, literature analysis, data analysis, manuscript drafting.

✉ **Correspondence should be addressed:** Egor A. Shitikov
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435, Russia; eshitikov@mail.ru

Received: 08.04.2022 **Accepted:** 30.04.2022 **Published online:** 15.05.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.024

Туберкулез, вызываемый микобактериями туберкулезного комплекса, представляет собой глобальную проблему для современного здравоохранения. По экспертным оценкам ВОЗ, в 2020 г. число умерших от заболевания возросло по сравнению с 2019 г. на 100 тыс. человек и составило 1,3 млн. В первую очередь это связано с уменьшением расходов на диагностику и лечение туберкулеза и повышенной нагрузкой на систему здравоохранения, вызванной пандемией COVID-19. Ожидается, что негативная тенденция сохранится в ближайшие несколько лет [1].

Несмотря на применение противотуберкулезной терапии, успех лечения туберкулеза, осложненного лекарственной устойчивостью, не превышает 60%. Повсеместно отмечаются случаи возникновения резистентности к новым препаратам, таким как линезолид, бедаквилин, клофозамин и т. д. [2]. В связи с этим актуальным становится поиск новых лекарственных препаратов, отличающихся принципиально иным механизмом действия, а также мишеней для противотуберкулезной терапии.

Одной из мишеней могут стать G-квадруплексы (G4) — неканонические вторичные структуры, формирующиеся в физиологических условиях гуанинсодержащими последовательностями ДНК и РНК. Структурная единица G4 — G-квартет — образован четырьмя гуаниновыми основаниями. Между собой G-квартеты удерживаются π - π -стекинг-взаимодействием, а также дополнительно стабилизируются катионами металлов [3].

Представленные структуры достаточно хорошо изучены у эукариотических организмов и играют важную роль в регуляции и поддержании стабильности генома [4]. В 2000-х гг. потенциальные квадруплекс-формирующие последовательности (putative quadruplex sequence, PQS) были обнаружены в геномах многочисленных бактерий и архей, однако их функциональная роль до сих пор до конца не исследована [5]. Установлено, что G4 могут влиять на различные аспекты физиологии бактерий, в том числе на выживание в неблагоприятных условиях, взаимодействие с макроорганизмом у патогенных бактерий, на антигенную изменчивость и т. д. [6].

G4-лиганды, часто представленные низкомолекулярными соединениями, способны связываться с квадруплексными последовательностями, тем самым влияя на их термическую стабильность, что в дальнейшем может приводить к нарушению действия различных белковых факторов и ферментов, функционально связанных с ДНК или РНК, и подавлять или активировать транскрипцию и трансляцию. К числу наиболее известных лигандов принадлежат

производное акридина BRACO-19 и катионный порфирин TMPyP4 (рис. 1). Возможность применения G4-лигандов в качестве потенциальных антимикробных соединений продемонстрирована для таких распространенных патогенов, как *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Mycobacterium tuberculosis* [6].

Для микобактерий туберкулеза, имеющих высокий GC-состав и значительную плотность PQS, исследование влияния G4-стабилизирующих лигандов на патоген представляется весьма перспективным. На бактериях уже показан ингибирующий эффект микромолярных концентраций известных лигандов с-exNDI-2, BRACO-19 и TMPyP4. В случае с с-exNDI-2 и BRACO-19 дополнительно продемонстрирован стабилизирующий эффект на отдельные квадруплексные последовательности, находящиеся в промоторных областях генов [7]. Для TMPyP4 установлено стабилизирующее действие на квадруплексы в генах, ассоциированных с вирулентностью [8].

Следует подчеркнуть, что во всех приведенных работах было исследовано влияние лигандов на отдельные G4-формирующие последовательности, причем наличие G4 всегда приводило к уменьшению экспрессии соответствующего гена под действием соединения. Ранее в нашей лаборатории был проанализирован транскриптомный ответ модельного микроорганизма *Mycobacterium smegmatis* MC²155 в ходе воздействия ингибирующих концентраций лигандов TMPyP4 (4 мкМ) и BRACO-19 (10 мкМ). Суммарно, изменение экспрессии было выявлено для 10 и 12% генов бактерии под действием TMPyP4 и BRACO-19 соответственно, однако статистической связи между дифференциально экспрессирующимися генами и наличием PQS обнаружено не было [9].

Целью работы было провести анализ влияния субингибирующих концентраций лигандов TMPyP4 (2 мкМ) и BRACO-19 (5 мкМ) на экспрессионный профиль *M. smegmatis* MC²155 и его сравнение с ранее полученными данными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальный штамм и условия культивирования

В исследовании использовали штамм *Mycobacterium smegmatis* MC²155. Культивировали при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, с использованием жидкой среды Миддлбрук 7H9 (HiMedia; Индия) или твердой среды Миддлбрук 7H11 (HiMedia; Индия) с добавлением 0,5% глицерина и 10% ростовой добавки

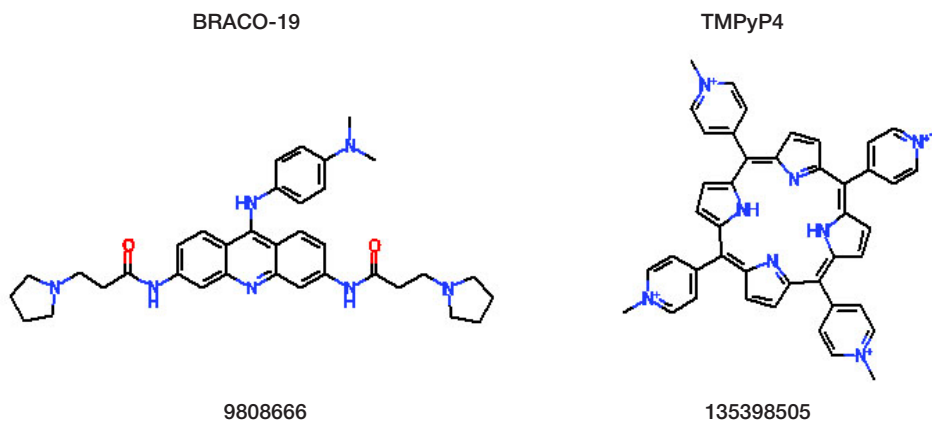


Рис. 1. Структурные формулы лигандов BRACO-19 и TMPyP4

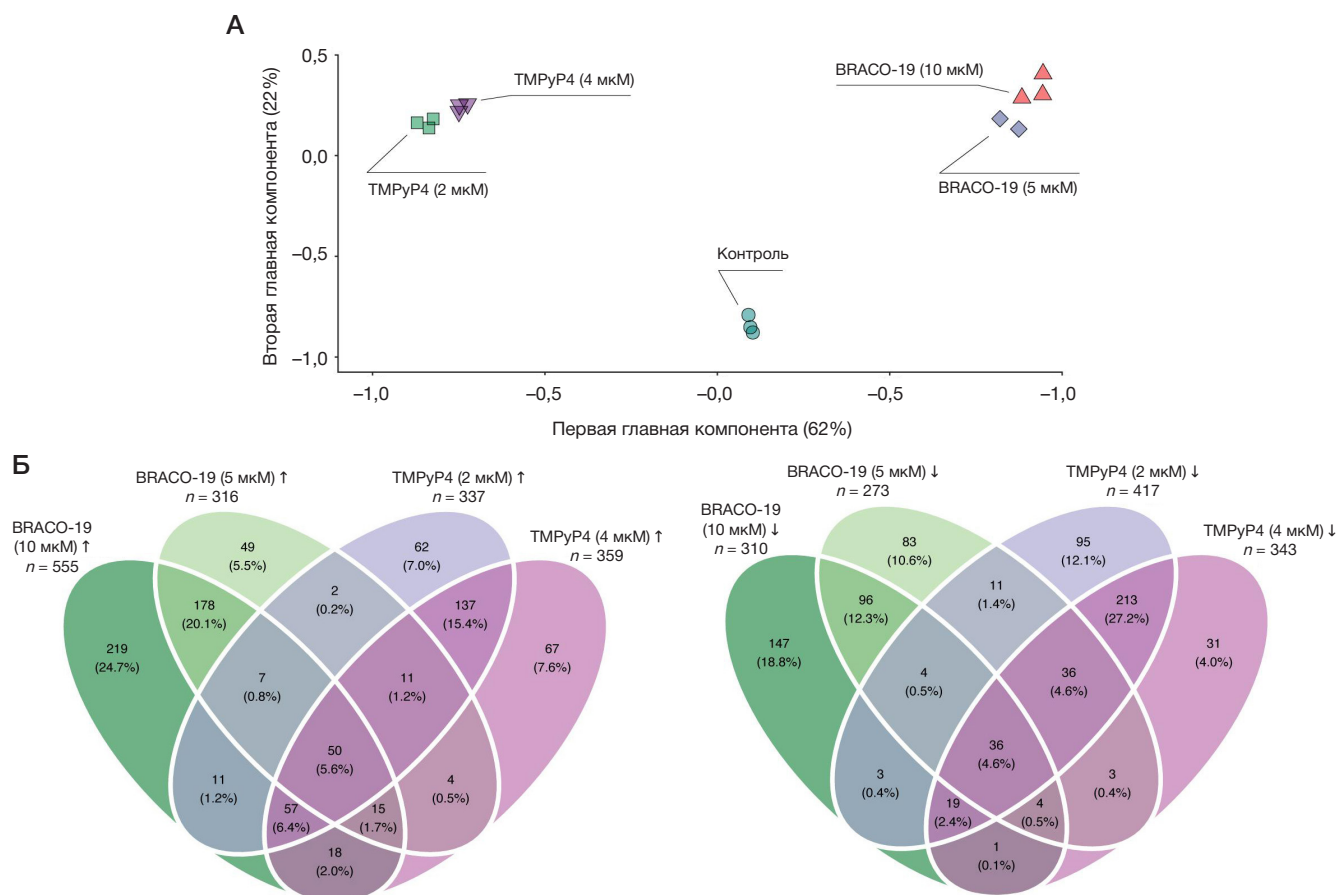


Рис. 2. Различия в уровнях транскрипции между образцами *Mycobacterium smegmatis*, обработанными BRACO-19 и ТМРyP4. **А.** Метод главных компонент показывает корреляцию уровней экспрессии генов в пяти разных условиях (обозначены разными цветами). **Б.** Диаграммы Венна показывают число пересекающихся генов, регулируемых присутствием соединений BRACO-19 и ТМРyP4 в разных концентрациях

Middelbrook OADC (HiMedia). Замороженные клетки высевали из музея на чашки и выращивали в течение 24 ч перед посевом в жидкую среду.

Культивирование бактерий для транскриптомного анализа проводили согласно предыдущей публикации [9]. Клетки *M. smegmatis* выращивали до оптической плотности 0,47 о.е, измеренной при 570 нм, что соответствовало середине экспоненциальной фазы, и переносили в пробирки объемом 5 мл (NUOVA ARTACA; Италия). В пробирки добавляли G4-стабилизирующие соединения до конечной концентрации, соответствующей половине минимальной ингибирующей концентрации (5 мкМ для BRACO-19 и 2 мкМ для ТМРyP4). К контрольным образцам добавляли такой же объем ДМСО (1% по объему). Бактериальные клетки инкубировали в течение 4 ч (время деления клеток описано ранее [10]) при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ в термостатируемом шейкере (250 об./мин). Эксперимент проводили в трех биологических повторах.

Выделение РНК и транскриптомный анализ

Экстракцию РНК и транскриптомное исследование проводили по методике, описанной ранее [9]. Бактериальные клетки собирали центрифугированием (8000 g, 10 мин, 4 °C), культуру промывали буфером PBS, затем добавляли RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen; США) для стабилизации РНК. Разрушение клеток проводили в двухмиллилитровых пробирках Lysing Matrix B на приборе MagNA Lyser (Roche; Швейцария) в течении 30 с. Далее РНК выделяли на автоматической станции King

Fisher (Thermo Fisher Scientific; США) набором MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Тотальную РНК обрабатывали набором TURBO DNA-free kit (Thermo Fisher Scientific) в объеме 50 мкл. Дополнительную очистку РНК проводили Agencourt RNA Clean XP kit (Beckman Coulter; США).

Для приготовления библиотек использовали 300 нг тотальной РНК. Удаление рибосомной РНК проводили набором Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit (Illumina; США) в соответствии с протоколом производителя. Набор NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB; США) был использован для приготовления транскриптомных библиотек. Далее библиотеки в эквимольном количестве смешивали, разводили до конечной концентрации 12 пМ и использовали для высокопроизводительного секвенирования на платформе HiSeq 2500 Illumina наборами HiSeq Rapid SBS Kit v2 (50 циклов) и HiSeq SR Rapid Cluster Kit v2 с добавлением в качестве контроля 1% Phix (Illumina). Данные секвенирования депонированы в NCBI под номером PRJNA765512.

Биоинформатический анализ

Секвенированные чтения были картированы на геном *M. smegmatis* MC2155 (CP000480.1) с использованием HISAT2 [11]. Программное обеспечение SAMtools [12] использовали для сортировки и преобразования файлов SAM в BAM и их последующего индексирования. Качество картирования и покрытие по генам оценивали с помощью QualiMap [13], отдельные отчеты объединяли с помощью MultiQC [14].

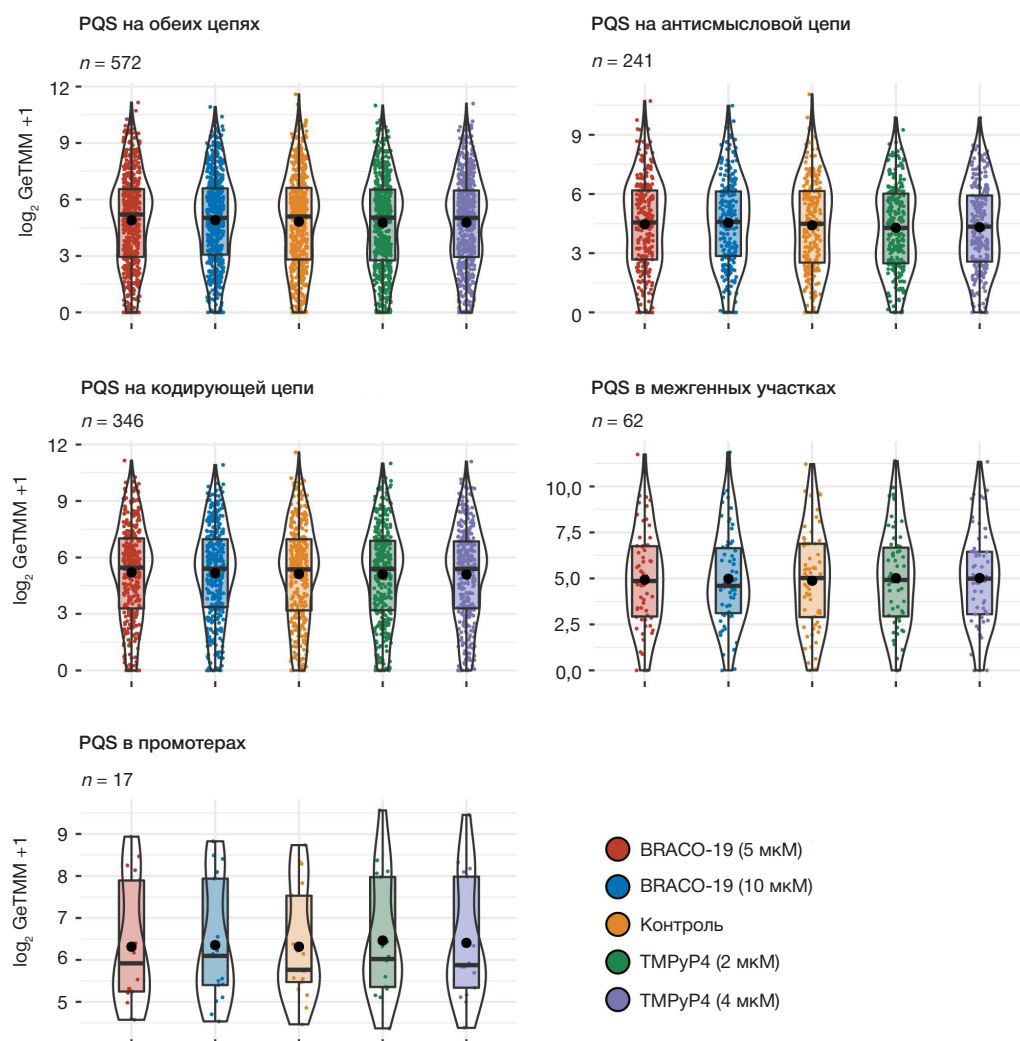


Рис. 3. Коробчатая диаграмма, показывающая различия в экспрессии генов, содержащих PQS, между контролем, при воздействии BRACO-19 и при воздействии TMPyP4. Число генов с PQS (n) не включает гены с низким количеством CPM (Counts Per Million), в случае межгенных участков включены оба гена. В рамке показаны верхний и нижний квартили, а линия внутри рамки показывает медиану. Черная точка указывает среднее значение. Games-Howell post hoc тест был использован для вычисления значения p

Картированные чтения были отнесены к генам с помощью featureCounts [15]. Дифференциальный анализ экспрессии генов выполняли с использованием пакета edgeR [16] для R. Гены с отсечкой частоты ложных обнаружений (FDR) 0,05 и порогом кратности изменения ($\log_2 \text{FC}$) [1] (т. е. ≥ 2 -кратное изменение) считали дифференциально экспрессируемыми. Для межвыборочного сравнения подсчеты были нормализованы с использованием усеченного среднего значения M с поправкой на длину гена [17]. Дальнейший анализ функционального обогащения терминов GO и путей KEGG для дифференциально экспрессируемых генов был выполнен с использованием пакета clusterProfiler [18], категории считали обогащенными, если $\text{FDR} \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние G4-стабилизирующих лигандов BRACO-19 и TMPyP4 на экспрессию генов *M. smegmatis* MC²155

Для оценки влияния лигандов BRACO-19 и TMPyP4 на экспрессию генов клетки *M. smegmatis* обрабатывали субингибирующими концентрациями соединений (5 μM и 2 μM соответственно) в течение 4 ч. Результаты РНК-

секвенирования сравнивали между собой, а также с ранее полученными данными.

Метод главных компонент показал кластеризацию повторов в каждом эксперименте, а также выраженную вариацию между обоими лигандами и контролем (рис. 2А). Однако в ходе анализа не было обнаружено существенной вариации между различными концентрациями одного лиганда.

Под действием BRACO-19 было идентифицировано 589 (316 \uparrow ; 273 \downarrow) и 865 (555 \uparrow ; 310 \downarrow) дифференциально экспрессированных генов, для 5 μM и 10 μM соответственно (рис. 2Б). Напротив, в случае с TMPyP4 обнаружено снижение числа дифференциально экспрессированных генов с 754 (337 \uparrow ; 417 \downarrow) до 702 (359 \uparrow ; 343 \downarrow) для концентраций 2 μM и 4 μM соответственно.

Влияние лигандов на экспрессию генов, связанных с потенциальными квадруплекс-формирующими последовательностями

Связь между изменением уровня экспрессии генов под действием лигандов и наличием потенциальных квадруплекс-формирующих последовательностей оценивали для следующих ранее установленных групп: PQS на обеих

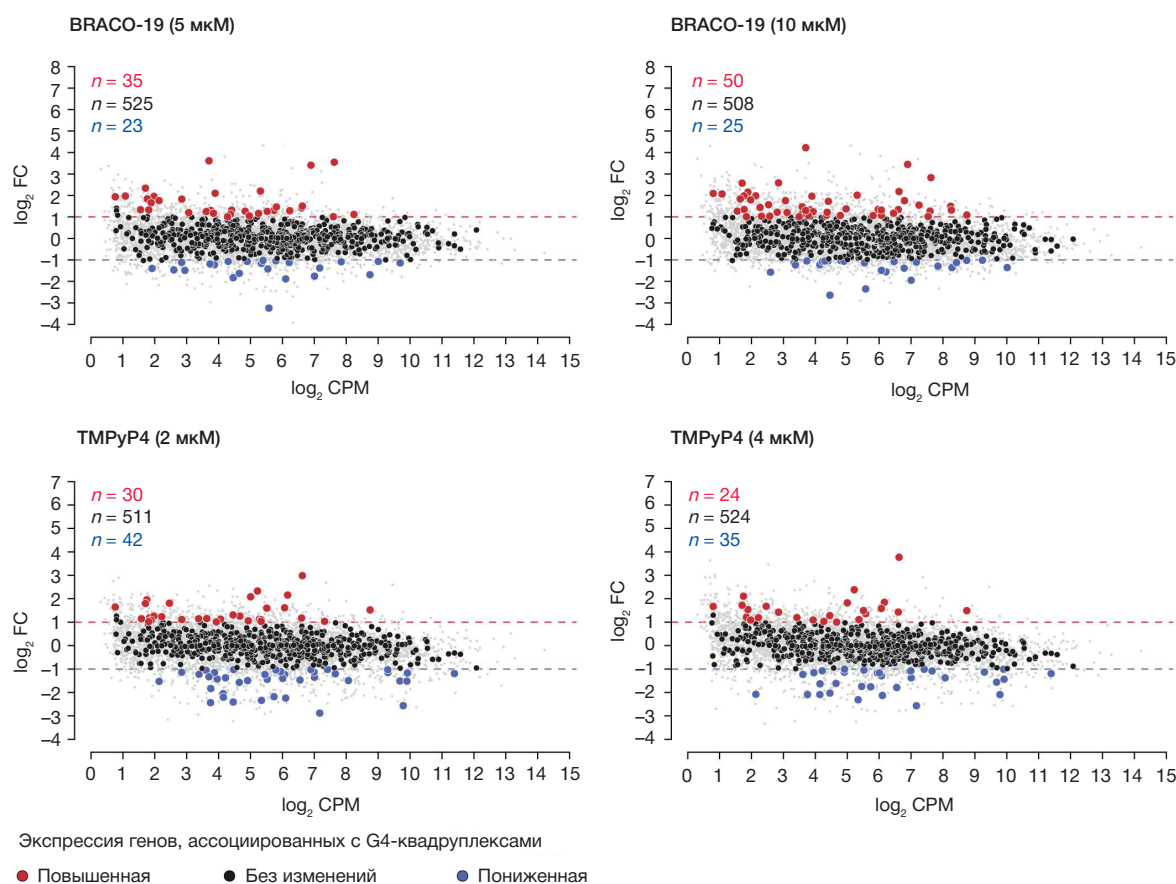


Рис. 4. График средней разницы (MD-plot) между уровнем изменения экспрессии ($\log_2 FC$) и средней экспрессией ($\log_2 CPM$) в генах, ассоциированных с потенциальными квадруплексами

цепях гена ($n = 665$) для 615 генов, PQS в смысловой цепи ($n = 267$) для 255 генов, PQS в матричной цепи ($n = 398$) для 360 генов, PQS в межгенных регионах ($n = 53$; 14/53 для двух генов), PQS в промоторных областях ($n = 17$) [9]. В ходе анализа для двух концентраций каждого из лигандов по сравнению с контрольными образцами не было выявлено статистически значимых различий ни для одной из представленных групп (Games-Howell post-hoc test $\text{padj.} > 0,05$; рис. 3).

Число дифференциально экспрессированных генов, ассоциированных с квадруплексами, увеличивалось ($58 \rightarrow 75$) с повышением концентрации BRACO-19 (5 мкМ \rightarrow 10 мкМ), но уменьшалось ($72 \rightarrow 59$) при повышении концентрации TMPyP4 (2 мкМ \rightarrow 4 мкМ) (рис. 4).

Изменения в системе репликации и репарации под действием лигандов

Анализ результатов РНК-секвенирования показал, что под действием лигандов BRACO-19 и TMPyP4 профили генов репликативной и репарационной систем *M. smegmatis* существенно различались см. таблицу. Так, воздействие BRACO-19 приводило к повышению экспрессии генов, кодирующих ДНК-гиразы, ДНК-полимеразы транслезионного синтеза (ТЛС), хеликазы и белки системы репарации. ТЛС ДНК-полимеразы являются белками SOS-ответа и отвечают за активное восстановление хромосомы [19]. ДНК-гиразы (ДНК-топоизомеразы типа II) участвуют в синтезе ДНК, катализируя введение отрицательных суперскрученных витков [20]. Метилтрансфераза Ogt и ДНК-гликозилаза AlkA противодействуют повреждению ДНК в процессе алкилирования [21]. Стоит отметить, что

воздействие субингибирующей концентрации BRACO-19 (5 мкМ) приводило к изменению экспрессии меньшего числа генов. При этом повышение концентрации BRACO-19 вызывало увеличение экспрессии в два и более раза только генов *ogt* и *alkA*, что может свидетельствовать о дозозависимом эффекте.

В случае с TMPyP4 единственным геном системы репарации с повышенной экспрессией был *ssbb*. Ген *ssbb* кодирует белок, который препятствует комплементарному спариванию одноцепочечной ДНК и участвует в процессах репликации и рекомбинационной репарации. Кроме того, экспрессия ДНК-хеликазы RecQ повышалась под действием обоих лигандов.

Изменения в метаболических путях *M. smegmatis* MC2155, вызванные G4-лигандами

Анализ GO-категорий и KEGG-путей выявил обогащение ($FDR < 0,05$; рис. 5) категорий, связанных с транскрипцией (GO:0006351), процессом биосинтеза аргинина (GO:0006526), транспортом (GO:0006810), метаболизмом серы (msm00920), биосинтезом нерибосомных пептидных сидерофоров (msm01053) и ABC-транспортерами (msm02010).

Как и в случае использования ингибирующих концентраций BRACO-19, воздействие меньшим количеством соединения привело к изменению единственного метаболического пути, связанного с железом. В ходе анализа была детектирована гиперэкспрессия генов, продукты которых ответственны за биосинтез сидерофоров, их транспорт и обратный захват. Напротив, гены, вовлеченные в запасание железа,

имели пониженную экспрессию. Важно отметить, что по уровню обогащения ответ бактериальной клетки на субингибирующие концентрации лиганда был сильнее.

Использование лиганда TMPyP4 привело к гиперэкспрессии генов транскрипционных факторов (GO:0006351) и путей, участвующих в метаболизме серы (msm00920). Последний путь был связан с обогащением транспортных систем при разных концентрациях соединения: гены категорий GO:0006810, msm02010 и msm00920 в большинстве пересекались между группами. В свою очередь гены, вовлеченные в биосинтез аминокислоты аргинина, характеризовались уменьшенной экспрессией, которая не зависела от концентрации лиганда.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данное исследование является продолжением проведенной ранее работы, в которой был рассмотрен транскриптомный ответ *M. smegmatis* на действие ингибирующих концентраций G4-стабилизирующих соединений BRACO-19 и TMPyP4 [9]. В представленной работе в ходе воздействия субингибирующих концентраций лигандов была предпринята попытка найти взаимосвязь PQS с изменением экспрессии генов, а также определить метаболические пути, являющиеся первичными ответчиками.

В ходе биоинформатического анализа было определено, что воздействие даже субингибирующими концентрациями лигандов приводит к изменению экспрессии существенного числа генов (рис. 2). Соединения показали противоположные результаты: увеличение

концентрации лигандов приводило к увеличению (в случае с BRACO-19) и уменьшению (TMPyP4) числа дифференциально экспрессированных генов. Дальнейший анализ результатов не выявил убедительных доказательств значимого повышения или понижения регуляции генов, связанных с PQS, вызванных G4-лигандами, в том числе не удалось найти конкретных доказательств опосредованной лигандами G4-стабилизации, зависимой от концентрации (рис. 3). Кроме того, мы проанализировали общие эффекты лигандов, изучив специфические гены, которые имели схожий для обоих лигандов вектор изменения экспрессии. Однако даже для генов, регулируемых одинаково обоими лигандами, нам не удалось найти конкретных доказательств опосредованной лигандами G4-стабилизации и дозозависимых эффектов. В ходе анализа не удалось также подтвердить стабилизацию ранее описанных для *M. tuberculosis* квадруплексных структур, в связи с существенной разницей в геномных последовательностях *M. tuberculosis* и *M. smegmatis*.

При анализе KEGG-путей и GO-категорий дозозависимый эффект тоже не был обнаружен. Все эффекты, наблюдаемые на уровне транскриптома и вызванные воздействием лигандов в субингибирующих концентрациях, коррелировали с таковыми при ингибирующих, результаты воздействия которых были опубликованы ранее [9] (рис. 5). Стоит отметить лишь систему метаболизма железа в случае с BRACO-19, показавшую больший уровень обогащения при воздействии субингибирующими концентрациями соединения. Данная система активируется в условиях дефицита железа, при окислительном и нитрозативном стрессах, а также в случае потребности в металлопротеинах, участвующих в

Таблица. Изменение уровня экспрессии генов системы репликации и репарации *M. smegmatis* под действием BRACO-19 и TMPyP4

Локус	Ген	Продукт	Экспрессия генов под действием BRACO-19 в сравнении с контролем		Экспрессия генов под действием TMPyP4 в сравнении с контролем	
			5 мкМ	10 мкМ	2 мкМ	4 мкМ
MSMEG_0005	<i>gyrB</i>	ДНК-гираза субъединица В	2,485372*	2,304708	-1,79363	-1,70249
MSMEG_0006	<i>gyrA</i>	ДНК-гираза субъединица А	2,152993	2,316561	-2,34404	-1,84273
MSMEG_1327	<i>recB</i>	Экзодезоксирибонуклеаза субъединица В	1,158257	1,240121	-2,16073	-2,2508
MSMEG_1620	<i>imuA'</i>	Гипотетический белок	1,957144	2,865713	1,419836	-1,08999
MSMEG_1622	<i>imuB</i>	Репаративная ДНК-полимераза	1,867917	2,435738	1,721681	1,944552
MSMEG_1633	<i>dnaE2</i>	ДНК-полимераза транслезионного синтеза	1,855874	2,529669	1,720836	1,865113
MSMEG_2442	<i>RNaseH2 (rnhB)</i>	Рибонуклеаза HII	1,845015	2,135989	1,353681	1,362699
MSMEG_3172	<i>dinB1</i>	ДНК-полимераза IV	2,069791	2,304246	1,066778	1,130623
MSMEG_3885	<i>helY</i>	РНК-хеликаза семейства DEAD/DEAH	2,540092	3,424716	-1,17839	-1,13342
MSMEG_4701	<i>ssbb</i>	Белок, связывающий одноцепочечную ДНК	1,509562	1,910513	2,236647	2,367929
MSMEG_4925	<i>alkA</i>	Регулятор транскрипции, белок семейства Ada/ДНК-3-метиладенингликозилаза II	3,608202	8,892216	1,477495	1,539172
MSMEG_4928	<i>ogt</i>	Цистеин метилтрансфераза	4,145998	9,941453	1,106208	1,357626
MSMEG_5397	<i>recQ</i>	АТФ-зависимая ДНК-хеликаза RecQ	3,156958	4,455866	2,107502	2,911045
MSMEG_5422	<i>mazG</i>	Пирофосфогидролаза	1,754292	1,586085	-2,46206	-2,19913
MSMEG_6443	<i>dinB3</i>	ДНК-полимераза IV	2,077001	2,867936	1,164152	1,261415
MSMEG_6896	<i>ssba</i>	Белок, связывающий одноцепочечную ДНК	-1,70995	-2,71083	-1,27025	-1,32274

Примечание: * — жирным выделены изменения экспрессии, которые отвечают следующим критериям: изменение более чем в два раза и FDR < 0,05.

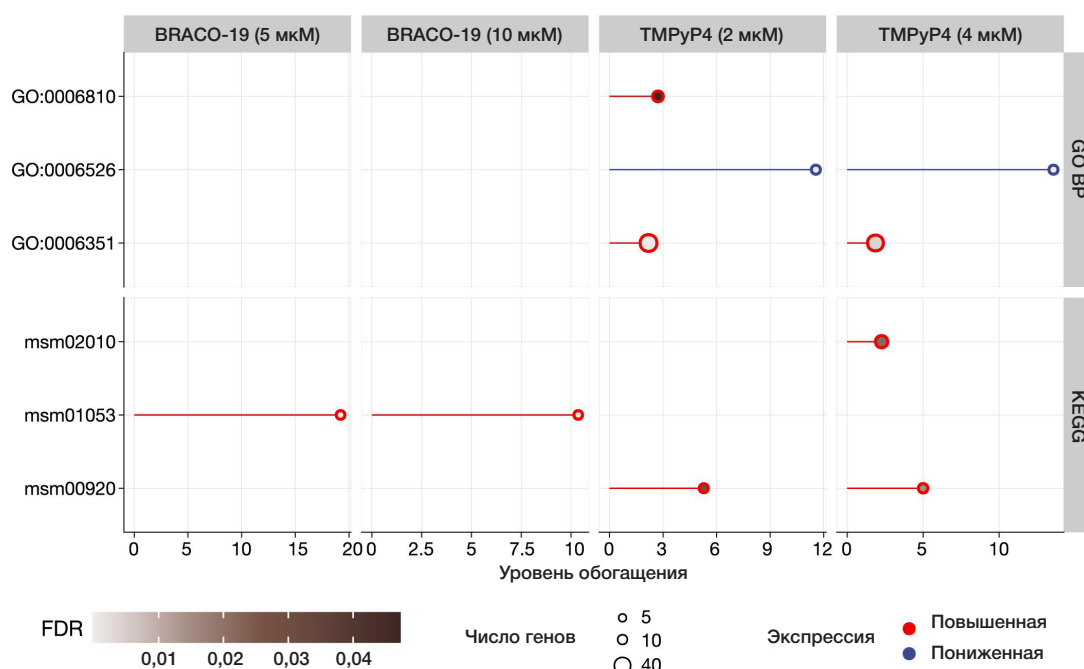


Рис. 5. GO-категории и KEGG-пути, обогащенные в образцах под действием различных концентраций BRACO-19 и TMPyP4. GO:0006810 — транспорт; GO:0006526 — биосинтез аргинина; GO:0006351 — ДНК-опосредованная транскрипция; msm02010 — ABC-транспортёры; msm01053 — биосинтез нерибосомных пептидов группы сидерофоров; msm00920 — метаболизм серы

репликации и репарации ДНК [22]. При субингибирующей концентрации BRACO-19 был перепредставлен путь биосинтеза нерибосомных пептидных сидерофоров (msm01053), включающий гены синтеза микобактина. Рассмотрение других систем пути выявило постепенное повышение экспрессии генов с увеличением концентрации лиганда.

Анализ генов системы репликации и репарации выявил единственный ген *recQ*, экспрессия которого была увеличена под действием субингибирующих концентраций BRACO-19 и TMPyP4. Для *E. coli* показано, что хеликаза RecQ способна разрешать квадруплексные структуры, однако белок RecQ в *M. smegmatis* не является гомологом белка из *E. coli* и отсутствует в *M. tuberculosis* [23]. Данное наблюдение говорит о необходимости дальнейшего исследования функций белка RecQ *M. smegmatis* на предмет его способности разрешать G4-структуры.

В дополнение следует отметить, что транскрипционный ответ микроорганизмов представляет собой сложное явление, модулируемое множественными факторами, включая специфичные системы регуляции, воздействие факторов внешней среды и др. Так, к примеру, в последнее время получены свидетельства того, что при определенных условиях квадруплексы, помимо ингибирующего действия, могут выступать в роли активаторов транскрипции. Для эукариотических организмов показано, что квадруплексы могут служить центрами связывания факторов транскрипции, изменять архитектуру хроматина, стабилизировать R-петли и т. д. [24]. Эксперименты на бактериях показали также, что стабилизация квадруплексов посредством производных нафталин диимида способна не только ингибировать

экспрессию у грамотрицательных микроорганизмов, но и усиливать ее у грамположительных, что указывает на двойственную природу квадруплекс-опосредованной регуляции [25]. Следует также отметить, что несмотря на то, что РНК-квадруплексы бактерий исследованы слабо, существуют свидетельства их наличия у микроорганизмов, как и их участия в регуляции биологических процессов [26]. Таким образом, разработка новых методов обнаружения и подтверждения квадруплексных структур, в том числе и протеомными экспериментами, в будущем обеспечит значительный прогресс в понимании роли отдельных G4 в регуляции генов.

ВЫВОДЫ

В настоящее время квадруплексы обнаружены в геномах значительного большинства микроорганизмов и, несомненно, являются важным элементом регуляции. Тем не менее в представленном исследовании не удалось выявить прямую связь между стабилизацией потенциальных квадруплексных структур и экспрессией генов, ассоциированных с ними. Оба соединения действовали на микроорганизм и приводили к изменению существенного количества транскриптов и метаболических путей. А обнаруженные изменения в генах факторов транскрипции и системы репликации и репарации, в случае использования лигандов, указывают на потенциальное действие на уровне РНК/ДНК, что согласуется с последними данными по квадруплекс-опосредованной регуляции генома. В свою очередь гиперэкспрессия гена хеликазы RecQ может служить основой для последующих исследований белка в качестве фермента, участвующего в разрешении квадруплексных структур.

Литература

1. Global Tuberculosis Report 2021 [cited 2022 Apr 7]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>.
2. Kadura S, King N, Nakhoul M, Zhu H, Theron G, Köser CU, et al. Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed Mycobacterium tuberculosis drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020; 75 (8): 2031.
3. Spiegel J, Adhikari S, Balasubramanian S. The structure and function of DNA G-quadruplexes. *Trends Chem*. 2020; 2 (2): 123–36.
4. Masai H, Tanaka T. G-quadruplex DNA and RNA: Their roles in regulation of DNA replication and other biological functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020; 531 (1): 25–38.
5. Bartas M, Cutová M, Brázda V, Kaura P, Št'Astný J, Kolomazník J, et al. The presence and localization of G-quadruplex forming sequences in the domain of bacteria. *Molecules*. 2019; 24 (9).
6. Yadav P, Kim N, Kumari M, Verma S, Sharma TK, Yadav V, et al. G-quadruplex structures in bacteria: biological relevance and potential as an antimicrobial target. *Journal of Bacteriology*. 2021; 203 (13).
7. Perrone R, Lavezzo E, Riello E, Manganelli R, Palù G, Toppo S, et al. Mapping and characterization of G-quadruplexes in Mycobacterium tuberculosis gene promoter regions. *Sci Rep*. 2017; 7 (1).
8. Mishra SK, Shankar U, Jain N, Sikri K, Tyagi JS, Sharma TK, et al. Characterization of G-quadruplex motifs in espB, espK, and cyp51 genes of mycobacterium tuberculosis as potential drug targets. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019; 16: 698–706.
9. Shitikov E, Bespiatykh D, Malakhova M, Bespiatykh J, Bodoev I, Vedekhina T, et al. Genome-wide transcriptional response of mycobacterium smegmatis MC 2 155 to G-quadruplex ligands BRACO-19 and TMPyP4. *Front Microbiol*. 2022; 13.
10. Logsdon MM, Aldridge BB. Stable regulation of cell cycle events in mycobacteria: insights from inherently heterogeneous bacterial populations. *Front Microbiol*. 2018; 9 (MAR).
11. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*. 2015; 12 (4): 357–60.
12. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009; 25 (16): 2078–9.
13. Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2016; 32 (2): 292–4.
14. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016; 32 (19): 3047–8.
15. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014; 30 (7): 923–30.
16. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010; 26 (1): 139–40.
17. Smid M, Coebergh van den Braak RRJ, van de Werken HJG, van Riet J, van Galen A, de Weerd V, et al. Gene length corrected trimmed mean of M-values (GeTMM) processing of RNA-seq data performs similarly in intersample analyses while improving intrasample comparisons. *BMC Bioinformatics*. 2018; 19 (1).
18. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012; 16 (5): 284–7.
19. W Yang, Y Gao. Translesion and repair DNA polymerases: diverse structure and mechanism. *Annu Rev Biochem*. 2018; 87: 239–61.
20. Mdululi K, Ma Z. Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase as a target for drug discovery. *Infect Disord Drug Targets*. 2007; 7 (2): 159–68.
21. Yang M, Aamodt RM, Dalhus B, Balasingham S, Helle I, Andersen P, et al. The ada operon of Mycobacterium tuberculosis encodes two DNA methyltransferases for inducible repair of DNA alkylation damage. *DNA Repair*. 2011; 10 (6): 595–602.
22. Namouchi A, Gómez-Muñoz M, Frye SA, Moen LV, Rognes T, Tønrum T, et al. The Mycobacterium tuberculosis transcriptional landscape under genotoxic stress. *BMC Genomics*. 2016; 17 (1): 1–13.
23. Wu X, Maizels N. Substrate-specific inhibition of RecQ helicase. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29 (8): 1765–71.
24. Robinson J, Raguseo F, Nuccio SP, Liano D, di Antonio M. DNA G-quadruplex structures: more than simple roadblocks to transcription? *Nucleic Acids Res*. 2021; 49 (15): 8419–31.
25. Cebrián R, Belmonte-Reche E, Pirota V, de Jong A, Morales JC, Freccero M, et al. G-quadruplex DNA as a target in pathogenic bacteria: efficacy of an extended naphthalene diimide ligand and its mode of action. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2021.
26. Shao X, Zhang W, Umar MI, Wong HY, Seng Z, Xie Y, et al. RNA G-quadruplex structures mediate gene regulation in bacteria. *mBio*. 2020; 11 (1).

References

1. Global Tuberculosis Report 2021 [cited 2022 Apr 7]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>.
2. Kadura S, King N, Nakhoul M, Zhu H, Theron G, Köser CU, et al. Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed Mycobacterium tuberculosis drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020; 75 (8): 2031.
3. Spiegel J, Adhikari S, Balasubramanian S. The structure and function of DNA G-quadruplexes. *Trends Chem*. 2020; 2 (2): 123–36.
4. Masai H, Tanaka T. G-quadruplex DNA and RNA: Their roles in regulation of DNA replication and other biological functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020; 531 (1): 25–38.
5. Bartas M, Cutová M, Brázda V, Kaura P, Št'Astný J, Kolomazník J, et al. The presence and localization of G-quadruplex forming sequences in the domain of bacteria. *Molecules*. 2019; 24 (9).
6. Yadav P, Kim N, Kumari M, Verma S, Sharma TK, Yadav V, et al. G-quadruplex structures in bacteria: biological relevance and potential as an antimicrobial target. *Journal of Bacteriology*. 2021; 203 (13).
7. Perrone R, Lavezzo E, Riello E, Manganelli R, Palù G, Toppo S, et al. Mapping and characterization of G-quadruplexes in Mycobacterium tuberculosis gene promoter regions. *Sci Rep*. 2017; 7 (1).
8. Mishra SK, Shankar U, Jain N, Sikri K, Tyagi JS, Sharma TK, et al. Characterization of G-quadruplex motifs in espB, espK, and cyp51 genes of mycobacterium tuberculosis as potential drug targets. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019; 16: 698–706.
9. Shitikov E, Bespiatykh D, Malakhova M, Bespiatykh J, Bodoev I, Vedekhina T, et al. Genome-wide transcriptional response of mycobacterium smegmatis MC 2 155 to G-quadruplex ligands BRACO-19 and TMPyP4. *Front Microbiol*. 2022; 13.
10. Logsdon MM, Aldridge BB. Stable regulation of cell cycle events in mycobacteria: insights from inherently heterogeneous bacterial populations. *Front Microbiol*. 2018; 9 (MAR).
11. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*. 2015; 12 (4): 357–60.
12. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009; 25 (16): 2078–9.
13. Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput

- sequencing data. *Bioinformatics*. 2016; 32 (2): 292–4.
14. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016; 32 (19): 3047–8.
15. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014; 30 (7): 923–30.
16. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010; 26 (1): 139–40.
17. Smid M, Coebergh van den Braak RRJ, van de Werken HJG, van Riet J, van Galen A, de Weerd V, et al. Gene length corrected trimmed mean of M-values (GeTMM) processing of RNA-seq data performs similarly in intersample analyses while improving intrasample comparisons. *BMC Bioinformatics*. 2018; 19 (1).
18. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012; 16 (5): 284–7.
19. W Yang, Y Gao. Translesion and repair DNA polymerases: diverse structure and mechanism. *Annu Rev Biochem*. 2018; 87: 239–61.
20. Mdluli K, Ma Z. Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase as a target for drug discovery. *Infect Disord Drug Targets*. 2007; 7 (2): 159–68.
21. Yang M, Aamodt RM, Dalhus B, Balasingham S, Helle I, Andersen P, et al. The ada operon of Mycobacterium tuberculosis encodes two DNA methyltransferases for inducible repair of DNA alkylation damage. *DNA Repair*. 2011; 10 (6): 595–602.
22. Namouchi A, Gómez-Muñoz M, Frye SA, Moen LV, Rognes T, Tønnum T, et al. The Mycobacterium tuberculosis transcriptional landscape under genotoxic stress. *BMC Genomics*. 2016; 17 (1): 1–13.
23. Wu X, Maizels N. Substrate-specific inhibition of RecQ helicase. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29 (8): 1765–71.
24. Robinson J, Raguseo F, Nuccio SP, Liano D, di Antonio M. DNA G-quadruplex structures: more than simple roadblocks to transcription? *Nucleic Acids Res*. 2021; 49 (15): 8419–31.
25. Cebrían R, Belmonte-Reche E, Pirota V, de Jong A, Morales JC, Freccero M, et al. G-quadruplex DNA as a target in pathogenic bacteria: efficacy of an extended naphthalene diimide ligand and its mode of action. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2021.
26. Shao X, Zhang W, Umar MI, Wong HY, Seng Z, Xie Y, et al. RNA G-quadruplex structures mediate gene regulation in bacteria. *mBio*. 2020; 11 (1).

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПРИ СЕМЕЙНОМ СЛУЧАЕ АКНЕ

О. М. Демина¹✉, А. Г. Румянцев^{1,2}, Н. Н. Потекаев¹¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия² Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

В настоящее время акне относится к наиболее распространенным дерматозам. Сообщается о роли генетической предрасположенности к развитию заболевания. Показано, что фактором риска развития дерматоза может быть наличие болезни у родственников первой линии родства. Представлен случай идентификации и определения значимости полиморфизма генов *NCF1*, *CD3E*, *ORAI1*, *IGHM*, *TAZ* у больных тяжелыми формами заболевания с отягощенным семейным анамнезом. Проведенные исследования позволили выявить идентичные аллельные варианты в пяти генах: *NCF1*, *CD3E*, *ORAI1*, *IGHM*, *TAZ* у двух близкородственных пациентов (отец и сын) с акне тяжелой степени. Полиморфизмы изученных генов, вероятно, влияют на развитие дисбаланса системы оксидаз, работу митохондрий, сниженной пролиферации Т-клеток, а также формирования дисбаланса секреции иммуноглобулинов. Полученные данные могут быть факторами торпидного течения тяжелой формы дерматоза, что определяет необходимость дальнейших исследований.

Ключевые слова: акне, полиморфизм генов, молекулярно-генетические исследования

Вклад авторов: О. М. Демина, А. Г. Румянцев, Н. Н. Потекаев — концепция и дизайн исследования, написание рукописи; О. М. Демина — анализ результатов, статистическая обработка данных; А. Г. Румянцев, Н. Н. Потекаев — редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокола № 138 от 13 октября 2014 г.); все участники исследования подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании, обработку персональных данных и использование данных в научных целях.

✉ Для корреспонденции: Ольга Михайловна Демина
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; demina.om@mail.ru

Статья получена: 03.04.2022 Статья принята к печати: 04.05.2022 Опубликована онлайн: 20.05.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.026

THE ROLE OF GENETIC FACTORS IN FAMILIAL CASE OF ACNE

Demina OM¹✉, Rumyantsev AG^{1,2}, Potekaev NN¹¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia² Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

Acne is one of the most common dermatoses. A prominent genetic component for this disease has been reported and the manifestation in first-line relatives is considered an important risk factor. Here we present a clinical case illustrating the relevance of particular genetic polymorphisms mapped to *NCF1*, *CD3E*, *ORAI1*, *IGHM* and *TAZ* in patients with severe forms and burdened family history of the disease. Genetic examination identified the same allelic variants in five candidate target genes (*NCF1*, *CD3E*, *ORAI1*, *IGHM* and *TAZ*) in two closely related patients (father and son) with severe acne. The identified genetic configuration may interfere with the oxidase activity and promote defects in mitochondrial function along with reduced T cell proliferation and imbalanced immunoglobulin production. The findings may provide an important reference point for further clinical investigation and treatment of severe torpid dermatoses.

Keywords: acne, genetic variant, oxidase system

Author contribution: Demina OM, Rumyantsev AG, Potekaev NN — study concept and design, manuscript writing; Demina OM — sequencing data management, computational research; Rumyantsev AG, Potekaev NN — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review Board at the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol number 138 of 13 October 2014). The participants provided written informed consent for the study including data processing and use for scientific purposes.

✉ Correspondence should be addressed: Olga M. Demina
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; demina.om@mail.ru

Received: 03.04.2022 Accepted: 04.05.2022 Published online: 20.05.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.026

Акне является наиболее распространенным заболеванием кожи и встречается в 35–90% случаев у подростков. Пики заболеваемости дерматоза регистрируют в возрасте от 14 лет до начала третьего десятилетия, но клинические симптомы болезни могут сохраняться и развиваться *de novo* в зрелом возрасте. По современным представлениям, согласно критериям ВОЗ по определению хронического течения болезней, акне рассматривают как хронический дерматоз. Многофакторный патогенез включает избыточное влияние андрогенов на сально-волосные фолликулы (СВФ), гиперсекрецию себума, патологическую фолликулярную кератинизацию, колонизацию *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) и развитие воспаления [1–3].

Сведения о гендерных особенностях заболевания показывают, что дерматоз чаще встречается у женщин, тогда

как более тяжелое течение заболевания отмечено у мужчин [1].

Имеются данные о генетической предрасположенности к развитию акне. Одним из основных факторов риска угрей может быть наличие болезни у родственников первой линии родства. В таких случаях повышается риск не только возникновения болезни, но и более тяжелого его течения. Показано возможное аддитивное влияние наличия анамнеза дерматоза по материнской и отцовской семьям на возникновение заболевания, так как при наличии дерматоза у обоих родителей риск появления акне у ребенка значительно возрастает [4, 5].

В связи с более тяжелым течением акне у мужчин и увеличением риска его возникновения у детей в случае болезни родителей, необходимы изучение и поиск молекулярно-генетических изменений у больных с этой патологией.

Описание клинического случая

В период 2019–2020 гг. на кафедре кожных болезней и косметологии факультета дополнительного профессионального образования под наблюдением находились двое больных с тяжелым течением акне: П., 45 лет и К., 17 лет (отец и сын). Оба обратились одновременно с жалобами на высыпания на коже лица, груди и спины. Из анамнеза известно, что пациент П. (отец) болен около 10 лет, т. е. заболевание началось во взрослом возрасте без предшествующего анамнеза акне в период пубертатного развития. Первые высыпания в виде множественных комедонов, папул и пустул появились на лице и в течение 6–7 месяцев распространились на кожу груди и спины. Заболевание характеризовалось появлением глубоких пустул, узлов, формированием сливающихся конгломератов, разрешавшихся с образованием атрофических рубцов, т. е. отмечались ухудшение течения кожного процесса и трансформация из среднетяжелого в тяжелое течение. Пациент проходил лечение у врача-дерматовенеролога по месту жительства антибактериальными препаратами (доксциклин 100 мг 2 раза в день) курсами по 14–21 день (три курса с интервалом 1,5–3 месяца), наружной терапией (клиндамицина фосфат, гель 1%-й, тонким слоем, на пораженную область кожи, предварительно очищенную и сухую, 2 раза в день в течение месяца в сочетании с адапаленом гелем 0,1%-м, раз в сутки (на ночь) на сухую чистую кожу пораженной области, терапия которым была продолжена в течение пяти месяцев) с временным положительным эффектом.

Из анамнеза второго пациента К. (сына) установлено, что первые признаки заболевания появились в возрасте 14 лет, когда отмечалось появление множественных комедонов, папул, глубоких пустул и узлов на коже лица, груди и спины. В дальнейшем течение заболевания имело непрерывно рецидивирующий характер, появлялись глубокие узлы, разрешающиеся атрофическими рубцами. Проходил лечение у врача-дерматовенеролога по месту жительства антибактериальными препаратами (доксциклин 100 мг 2 раза в день) курсами по 14–21 день (4 курса с интервалом 2–4 месяца), наружной терапией (клиндамицина фосфат, гель 1%-й, тонким слоем, на пораженную область кожи, предварительно очищенную и сухую, 2 раза в день в течение месяца в сочетании с адапаленом гелем 0,1%-м раз в сутки (на ночь) на сухую чистую кожу пораженной области, терапия которым была продолжена до пяти месяцев; с последующим применением азелаиновой кислоты, гель 15%-й, 2 раза в сутки (утром и вечером) до 6 месяцев). Положительный эффект был временный. Кроме того, семейный анамнез обоих пациентов отягощен по онкопатологии: отец (по отношению к первому пациенту) и дед (по отношению ко второму пациенту) по отцовской линии болен раком прямой кишки.

С целью определения роли генетических факторов в развитии акне пациентам было проведено молекулярно-генетическое исследование методом высокопроизводительного секвенирования ДНК — секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS). Геномную ДНК выделяли из образцов цельной крови обследованных больных с использованием набора CellSep Advanced Kit. (DiaSorin Ireland Ltd.; Ирландия) согласно инструкции производителя. Индивидуальные лигированные библиотеки собирали с помощью набора NebNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs; США). Для пробоподготовки использовали

методику гибридационного селективного обогащения фрагментами ДНК, относящимися к кодирующим областям перечисленных генов, с применением кастомной панели зондов (Roche; Швейцария), согласно протоколу производителя по проведению реакции обогащения с библиотекой зондов SeqCap EZ для секвенаторов «Illumina». Анализ ДНК пациентов проводили на платформе MiSeq (Illumina; США) методом парно-концевого чтения (115 × 2) со средней глубиной прочтения 143× и покрытием целевого региона 99% при глубине прочтения не менее 10×. Данные секвенирования обрабатывали с использованием автоматизированного алгоритма биоинформатического анализа.

Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использовали данные международного проекта gnomAD Exomes (ExAC) для экзонных вариантов и базы gnomAD Genomes для интронных вариантов. Для компьютерной оценки патогенности найденных миссенс-вариантов применяли программы предсказания патогенности замен аминокислот (SIFT, PolyPhen-2, PROVEAN, UMD Predictor). Для компьютерного предсказания эффекта изменений в сайтах сплайсинга или прилежащих к сайту сплайсинга участках использовали программы MutationTaster, Human Splicing Finder и NNSplice.

Обсуждение клинического случая

Молекулярно-генетические исследования позволили выявить идентичные аллельные варианты в пяти генах у наблюдаемых нами пациентов: *NCF1*, *CD3E*, *Orai1*, *IGHM*, *TAZ* (таблица). В четырех генах (*NCF1*, *CD3E*, *Orai1*, *TAZ*) полиморфизмы были выявлены в экзонах. В гене *IGHM* идентифицировано два аллельных варианта *rs1059216* и *rs1136534*, которые локализовались в межгенном регионе и имели однонуклетидные полиморфизмы (SNP): C>T (несинонимичная замена) и A>G (синонимичная).

Анализ гомо- и гетерозиготности выявленных аллельных вариантов показал, что полиморфизм *rs707410* гена *NCF1* был идентифицирован в гомозиготном состоянии, один аллельный вариант *rs1059216* гена *IGHM* — в гомозиготе, второй *rs1136534* — в гетерозиготе, вариант *rs62617809* гена *TAZ* — в гомозиготе. Аллельные варианты гена *CD3E* (с.353-16A>C) — в гетерозиготе и гена *Orai1* (GGCCCC>G) — в гомозиготе ранее не были описаны ни при одном заболевании.

При анализе популяционных частот встречаемости идентифицированных аллельных вариантов генов *NCF1*, *CD3E*, *Orai1*, *IGHM*, *TAZ* у больных тяжелой степени акне по базе gnomAD Exomes (ExAC) было установлено, что такие варианты также ранее не были описаны ни при одном заболевании.

Полученные нами данные об аллельных вариантах пяти генов у двух близкородственных пациентов были идентичны, часть из идентифицированных аллельных вариантов гена *CD3E* (с.353-16A>C) — в гетерозиготе и гена *Orai1* (GGCCCC>G) — в гомозиготе выявлены впервые не только у больных акне, но и в целом среди всех заболеваний.

Ген *NCF1* (neutrophil cytosolic factor-1, NCF1) кодирует белок, являющийся цитозольной субъединицей НАДФН-оксидазы нейтрофилов (47 кДа). Важной биологической характеристикой функциональной значимости этих ферментов являются их локализация на плазматической мембране макрофагов и обеспечение антимикробной защиты клеток. Имеются данные о том, что мутации в

Таблица. Характеристика аллельных вариантов генов *NCF1*, *CD3E*, *ORAI1*, *IGHM*, *TAZ* у больных с тяжелой формой акне

Признак	<i>NCF1</i>	<i>CD3E</i>	<i>ORAI1</i>	<i>IGHM</i>	<i>TAZ</i>
Хромосома	7	11	12	14	X
Позиция изменений на хромосоме	74777361	118313691	121626865- 121626870	105855558, 105855808	154412069
Аллельные варианты	<i>rs707410</i>	Не описан ранее	Не описан ранее	<i>rs1059216</i> , <i>rs1136534</i>	<i>rs62617809</i>
Локализация в гене	2-й экзон в области сплайсинга	7-й экзон в области сплайсинга	1-й экзон в области сплайсинга	межгенный регион	2-й экзон
Вид и позиция замены	c.153+14T>C	c.353-16A>C	GGCCCC> G	C>T (несинонимичная); A>G (синонимичная)	c.110-17T>C
Гомозигота/гетерозигота	Гомозигота	Гетерозигота	Гомозигота	Гомозигота, гетерозигота	Гомозигота

NCF1 выявляются при хроническом гранулематозе, который наследуется по аутосомно-рецессивному типу [6]. Сообщается о возможной ассоциации полиморфизма *rs201802880* гена *NCF1*-339 с системной красной волчанкой [7].

Выявлен аллельный вариант *rs707410* гена *NCF1* у обоих пациентов в гомозиготе, который, возможно, оказывает влияние на развитие дисбаланса системы оксидаз, и уменьшение активности фагоцитарного звена, что удлиняет воспаление и клинически реализуется в тяжелом течении акне.

Ген *CD3E* кодирует полипептидный белок CD3-эпсилон (CD3E). Объединяясь с CD3-гамма, -дельта и -зета, этот белок образует комплекс с Т-клеточным рецептором (T-cell receptor-CD3, TCR-CD3). CD3E является трансмембранным белком, регулирующим развитие Т-клеток и адаптивный иммунитет [8]. Мутация в *CD3E* вызывает формирование тяжелого комбинированного иммунодефицита [9].

В нашем исследовании у обоих пациентов с акне был идентифицирован аллельный вариант гена *CD3E* (c.353-16A>C) в гетерозиготном состоянии, что, вероятно, определяет недостаточную пролиферацию Т-лимфоцитов и в последующем недостаточность адаптивного иммунитета.

Ген *ORAI1* (ORAI calcium release-activated calcium modulator 1) кодирует белок — кальций релиз-активированный протеин кальциевых каналов 1. Такие кальциевые каналы обеспечивают основное поступление кальция в Т-лимфоциты и их активацию [10]. По данным исследований, развитие мутации в гене *ORAI1* приводит к тяжелому комбинированному иммунодефициту [11]. При аллергических дерматозах кальциевые каналы ORAI1 могут иметь большое значение, хотя механизм этого участия до конца не изучен [12]. Формирование мутаций *de novo* в гене *ORAI1* вызывает снижение NK-клеток и T_{reg}, обеспечивая развитие иммунодефицита и аутоиммунного воспаления. Такие мутации были выявлены при ангидротической эктодермальной дисплазии [13].

Выявленный нами аллельный вариант гена *ORAI1* (GGCCCC> G) в гомозиготе у обоих пациентов может внести вклад в формирование вторичной иммунологической недостаточности.

Ген *IGHM* (immunoglobulin heavy constant mu) кодирует константную область тяжелых цепей иммуноглобулина. Активированные антигенами В-клетки в эффекторной фазе гуморального иммунитета синтезируют иммуноглобулины и обеспечивают удаление антигенов. Установлено, что при развитии мутаций в гене *IGHM* формируется аутосомно-рецессивная форма агаммаглобулинемии [14].

В нашем исследовании у обоих пациентов с акне были выявлены два идентичных полиморфизма гена *IGHM*: один аллельный вариант *rs1059216* — в гомозиготе, второй *rs1136534* — в гетерозиготе, и, по-видимому, именно первый гомозиготный вариант с несинонимичной заменой может определять дисбаланс синтеза иммуноглобулинов, приводя к торпидной тяжелой степени акне.

Особый интерес представляет изучение генов, расположенных в половых хромосомах. Ген *TAZ* (tafazzin) локализован на X-хромосоме (Xq18), имеет 11 экзонов и кодирует белок тафазин, участвующий в метаболизме кардиолипина в составе внутренней мембраны митохондрий. Снижение энергетического обмена в лейкоцитах ведет к нарушению их дифференцировки, что вызывает снижение активности иммунитета и рецидивирование инфекций. При наличии мутации в этом гене может развиваться синдром Барта [15].

Выявленный нами аллельный вариант *rs62617809* гена *TAZ* в гомозиготном состоянии идентичен у обоих пациентов, что может быть фактором дисбаланса функционирования митохондрий, включая клеточное звено иммунитета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные молекулярно-генетические исследования у двух родственников первой линии родства позволили нам идентифицировать полиморфизмы в четырех генах (*NCF1*, *CD3E*, *ORAI1*, *TAZ*), локализованные в экзонах, т. е. кодируемых областях генов. В гене *IGHM* выявлено два аллельных варианта *rs1059216* и *rs1136534*, локализованные в межгенном регионе и имеющие следующие SNP: C>T (несинонимичная) и A>G (синонимичная). Полученные нами данные об аллельных вариантах в пяти генах у двух близкородственных пациентов были идентичны, часть из идентифицированных аллельных вариантов: ген *CD3E* (c.353-16A>C) — в гетерозиготе и ген *ORAI1* (GGCCCC> G) — в гомозиготе выявлены впервые.

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить идентичные аллельные варианты в пяти генах: *NCF1*, *CD3E*, *ORAI1*, *IGHM*, *TAZ* у двух близкородственных пациентов (отец и сын) с тяжелой степенью акне, что, вероятно, оказывает влияние на формирование дисбаланса системы оксидаз, функционирования митохондрий, недостаточной пролиферации Т-клеток и активации их кальциевых каналов, дисбаланса синтеза иммуноглобулинов. Это может служить одним из этиологических факторов торпидного течения тяжелой степени акне и требует дальнейшего изучения.

Литература

- Heng AS, Chew FT. Systematic review of the epidemiology of acne vulgaris. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 5754. PubMed PMID: 32238884 DOI: 10.1038/s41598-020-62715-3.
- Cong TX, Hao D, Wen X, Li XH, He G, Jiang X. From pathogenesis of acne vulgaris to anti-acne agents. *Arch Dermatol Res.* 2019; 311 (5): 337–49. PubMed PMID: 30859308 DOI: 10.1007/s00403-019-01908-x.
- Lichtenberger R, Simpson MA, Smith C, Barker J, Navani AA. Genetic architecture of acne vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017; 31: 1978–90. PubMed PMID: 28593717 DOI: 10.1111/jdv.14385.
- Xu SX, Wang HL, Fan X, Sun LD, Yahg S, Wang PG, et al. The familial risk of acne vulgaris in Chinese Hans — a case-control study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007; 21: 602–5. PubMed PMID:17447973 DOI: 10.1111/j.1468-3083.2006.02022.x.
- Abo El-Fetoh NM, Alenezi NG, Alshamari NG, Alenezi OG. Epidemiology of acne vulgaris in adolescent male students in Arar, Kingdom of Saudi Arabia. *J Egypt Public Health Assoc.* 2016; 91 (3): 144–9. PubMed PMID: 27749646 DOI: 10.1097/01.EPX.0000492401.39250.62.
- Kuhns DB, Hsu AP, Sun D, Lau K, Fink D, Griffith P, et al. NCF1 (p47phox)-deficient chronic granulomatous disease: comprehensive genetic and flow cytometric analysis. *Blood Adv.* 2019; 3 (2): 136–47. PubMed PMID: 30651282 DOI: 10.1182/bloodadvances.2018023184.
- Linge P, Arve S, Olsson LM, Leonard D, Sjöwall C, Frodlund M, et al. NCF1-339 polymorphism is associated with altered formation of neutrophil extracellular traps, high serum interferon activity and antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2020; 79 (2): 254–61. PubMed PMID: 31704719 DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-215820.
- Li L, Guo X, Shi X, Li C, Wu W, Yan C, et al. Ionic CD3-Lck interaction regulates the initiation of T-cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017; 114 (29): E5891–9. PubMed PMID: 28659468 DOI: 10.1073/pnas.1701990114.
- Firtina S, Ng YY, Ng OH, Nepesov S, Yesilbas O, Kilercik M, et al. A novel pathogenic frameshift variant of CD3E gene in two T-B+ NK+ SCID patients from Turkey. *Immunogenetics.* 2017; 69 (10): 653–9. PubMed PMID: 28597365 DOI: 10.1007/s00251-017-1005-7.
- Bhardway R, Hediger M, Demareux N. Redox modulation of Stim-Orai signaling. *Cell Calcium.* 2016; 60: 142–52. PubMed PMID:27041216 DOI: 10.1016/j.ceca.2016.03.006.
- Thompson JL, Mignen O, Shuttleworth TJ. The Orai1 severe combined immune deficiency mutation and calcium release-activated Ca²⁺ channel function in the heterozygous condition. *J Biol Chem.* 2009; 284 (11): 6620–6. PubMed PMID: 19075015 DOI: 10.1074/jbc.M808346200.
- Yan S, Chen W, Zhang Y, Li J, Chen X. Calcium release-activated calcium modulator 1 as a therapeutic target in allergic skin diseases. *Life Sci.* 2019; 228: 152–7. PubMed PMID: 31055088 DOI: 10.1016/j.lfs.2019.05.001.
- Lian J, Cuk M, Kahlfuss S, Kozhaya L, Vaeth M, Rieux-Laucat F, et al. ORAI1 mutations abolishing store-operated Ca²⁺ entry cause anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 142 (4): 1297–310. PubMed PMID: 29155098 DOI: 10.1016/j.jaci.2017.10.031.
- Silva P, Justicia A, Regueiro A, Fariña S, Couselo JM, Loidi L. Autosomal recessive agammaglobulinemia due to defect in μ heavy chain caused by a novel mutation in the IGHM gene. *Genes Immun.* 2017; 18 (3): 197–9. DOI: 28769069 10.1038/gene.2017.14.
- Zapała B, Platek T, Wybrańska I. A novel TAZ gene mutation and mosaicism in a Polish family with Barth syndrome. *Ann Hum Genet.* 2015; 79 (3): 218–24. PubMed PMID: 25776009 DOI: 10.1111/ahg.12108.

References

- Heng AS, Chew FT. Systematic review of the epidemiology of acne vulgaris. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 5754. PubMed PMID: 32238884 DOI: 10.1038/s41598-020-62715-3.
- Cong TX, Hao D, Wen X, Li XH, He G, Jiang X. From pathogenesis of acne vulgaris to anti-acne agents. *Arch Dermatol Res.* 2019; 311 (5): 337–49. PubMed PMID: 30859308 DOI: 10.1007/s00403-019-01908-x.
- Lichtenberger R, Simpson MA, Smith C, Barker J, Navani AA. Genetic architecture of acne vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017; 31: 1978–90. PubMed PMID: 28593717 DOI: 10.1111/jdv.14385.
- Xu SX, Wang HL, Fan X, Sun LD, Yahg S, Wang PG, et al. The familial risk of acne vulgaris in Chinese Hans — a case-control study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007; 21: 602–5. PubMed PMID:17447973 DOI: 10.1111/j.1468-3083.2006.02022.x.
- Abo El-Fetoh NM, Alenezi NG, Alshamari NG, Alenezi OG. Epidemiology of acne vulgaris in adolescent male students in Arar, Kingdom of Saudi Arabia. *J Egypt Public Health Assoc.* 2016; 91 (3): 144–9. PubMed PMID: 27749646 DOI: 10.1097/01.EPX.0000492401.39250.62.
- Kuhns DB, Hsu AP, Sun D, Lau K, Fink D, Griffith P, et al. NCF1 (p47phox)-deficient chronic granulomatous disease: comprehensive genetic and flow cytometric analysis. *Blood Adv.* 2019; 3 (2): 136–47. PubMed PMID: 30651282 DOI: 10.1182/bloodadvances.2018023184.
- Linge P, Arve S, Olsson LM, Leonard D, Sjöwall C, Frodlund M, et al. NCF1-339 polymorphism is associated with altered formation of neutrophil extracellular traps, high serum interferon activity and antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2020; 79 (2): 254–61. PubMed PMID: 31704719 DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-215820.
- Li L, Guo X, Shi X, Li C, Wu W, Yan C, et al. Ionic CD3-Lck interaction regulates the initiation of T-cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017; 114 (29): E5891–9. PubMed PMID: 28659468 DOI: 10.1073/pnas.1701990114.
- Firtina S, Ng YY, Ng OH, Nepesov S, Yesilbas O, Kilercik M, et al. A novel pathogenic frameshift variant of CD3E gene in two T-B+ NK+ SCID patients from Turkey. *Immunogenetics.* 2017; 69 (10): 653–9. PubMed PMID: 28597365 DOI: 10.1007/s00251-017-1005-7.
- Bhardway R, Hediger M, Demareux N. Redox modulation of Stim-Orai signaling. *Cell Calcium.* 2016; 60: 142–52. PubMed PMID:27041216 DOI: 10.1016/j.ceca.2016.03.006.
- Thompson JL, Mignen O, Shuttleworth TJ. The Orai1 severe combined immune deficiency mutation and calcium release-activated Ca²⁺ channel function in the heterozygous condition. *J Biol Chem.* 2009; 284 (11): 6620–6. PubMed PMID: 19075015 DOI: 10.1074/jbc.M808346200.
- Yan S, Chen W, Zhang Y, Li J, Chen X. Calcium release-activated calcium modulator 1 as a therapeutic target in allergic skin diseases. *Life Sci.* 2019; 228: 152–7. PubMed PMID: 31055088 DOI: 10.1016/j.lfs.2019.05.001.
- Lian J, Cuk M, Kahlfuss S, Kozhaya L, Vaeth M, Rieux-Laucat F, et al. ORAI1 mutations abolishing store-operated Ca²⁺ entry cause anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 142 (4): 1297–310. PubMed PMID: 29155098 DOI: 10.1016/j.jaci.2017.10.031.
- Silva P, Justicia A, Regueiro A, Fariña S, Couselo JM, Loidi L. Autosomal recessive agammaglobulinemia due to defect in μ heavy chain caused by a novel mutation in the IGHM gene. *Genes Immun.* 2017; 18 (3): 197–9. DOI: 28769069 10.1038/gene.2017.14.
- Zapała B, Platek T, Wybrańska I. A novel TAZ gene mutation and mosaicism in a Polish family with Barth syndrome. *Ann Hum Genet.* 2015; 79 (3): 218–24. PubMed PMID: 25776009 DOI: 10.1111/ahg.12108.

МЕЖМЕМБРАННАЯ ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ М-БЕЛКА КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2: ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ПОЧКОВАНИИ ВИРУСА

Е. Л. Соколинская, Л. В. Путляева, А. А. Горшкова, К. А. Лукьянов ✉

Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Несмотря на интенсивные исследования, стимулированные катастрофическими последствиями пандемии COVID-19, точные молекулярные механизмы некоторых стадий жизненного цикла коронавируса SARS-CoV-2, в частности, отрыва вирусных частиц при почковании, остаются неизвестными. При экспрессии М-белка SARS-CoV-2 в клетках человека мы наблюдали образование специфических структур эндоплазматического ретикула, появление которых свидетельствует о способности М-белка к олигомеризации в составе параллельных мембран. На наш взгляд, такая межмембранная олигомеризация М-белка может быть движущей силой для сближения и слияния мембран при отшнуровывании вирусных частиц SARS-CoV-2.

Ключевые слова: мембранный белок SARS-CoV-2, белок-белковые взаимодействия, флуоресцентная микроскопия, эндоплазматический ретикулум, почкование вирусных частиц

Финансирование: работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант 20-04-60370.

Вклад авторов: Е. Л. Соколинская, Л. В. Путляева, А. А. Горшкова — проведение экспериментов; К. А. Лукьянов — концепция и написание статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Константин Анатольевич Лукьянов
Большой бульвар, д. 30, стр. 1, Москва, 121205, Россия; lukyanov.konstantin@gmail.com

Статья получена: 13.05.2022 **Статья принята к печати:** 28.05.2022 **Опубликована онлайн:** 04.06.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.029

INTERMEMBRANE OLIGOMERIZATION OF SARS-COV-2 M-PROTEIN: POSSIBLE ROLE IN VIRAL BUDDING

Sokolinskaya EL, Putlyayeva LV, Gorshkova AA, Lukyanov KA ✉

Center for Molecular and Cellular Biology, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

Despite the extensive research spurred by the catastrophic effects of COVID-19 pandemic, precise molecular mechanisms of some stages in SARS-CoV-2 life cycle remain elusive. One of such stages is the detachment of viral particles during budding. Using confocal fluorescence microscopy, we observed formation of specific structures by endoplasmic reticulum in human cells expressing SARS-CoV-2 M-protein, implicating oligomerization of M-protein across parallel membranes. In our opinion, such intermembrane oligomerization may provide a driving force for pinching off the viral particles during SARS-CoV-2 budding.

Keywords: SARS-CoV-2 membrane protein, protein-protein interactions, fluorescence microscopy, endoplasmic reticulum, OSER structures, viral budding

Funding: the study was funded by the Russian Foundation for Basic Research, project number 20-04-60370.

Author contribution: Sokolinskaya EL, Putlyayeva LV, Gorshkova AA — experiments; Lukyanov KA — concept and writing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Konstantin A. Lukyanov
Bolshoy Bulvar, 30, str. 1, Moscow, 121205, Russia; lukyanov.konstantin@gmail.com

Received: 13.05.2022 **Accepted:** 28.05.2022 **Published online:** 04.06.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.029

Продолжающаяся пандемия SARS-CoV-2 заставляет нас признать, что наши нынешние возможности лечения угрожающих жизни зоонозных коронавирусных инфекций очень ограничены. Комбинированное применение препаратов, воздействующих на разные молекулярные мишени, представляется перспективной стратегией по предотвращению быстрой адаптации вируса к терапии. Таким образом, разработка скрининговых платформ и поиск ингибиторов с новым механизмом действия являются высокоактуальной задачей.

Зрелый вирион SARS-CoV-2 несет одноцепочечный РНК-геном (кодирующую цепь) и четыре структурных белка — N, M, S и E [1, 2]. Растворимый нуклеокапсидный белок N обеспечивает связывание и компактизацию вирусной РНК. Остальные структурные белки представляют собой интегральные мембранные белки. S-белок обеспечивает специфичное связывание с рецептором ACE2 на поверхности клеток и последующую интернализацию в клетку и слияние мембран вируса и хозяйской клетки. В структуре этого крупного (1272 аминокислотных остатка (а. о.)) гомотримерного белка можно выделить большую внеклеточную N-концевую часть, одну трансмембранную спираль и небольшой цитоплазматический C-концевой домен. Наиболее представлен в вирионе SARS-CoV-2 М-белок. Считается, что он играет

центральную роль в формировании вирусных частиц, обеспечивая необходимые взаимодействия с N-белком (и, соответственно, с геномом вируса), а также с другими структурными белками. М-белок длиной 222 а. о. имеет короткую внеклеточную N-концевую часть, три трансмембранных сегмента и C-концевой внутриклеточный домен. Структура М-белка SARS-CoV-2 не определена экспериментально, однако имеются модели, основанные на гомологичных белках. Е-белок имеет длину 75 а. о., формирует гомопентамер и представлен в вирионе всего несколькими копиями. N-конец этого белка экспонирован во внеклеточное пространство, далее идет один трансмембранный сегмент и небольшой цитоплазматический C-концевой домен. Имеющиеся данные указывают на роль Е-белка в формировании вирусных частиц, а также в его функционировании в качестве ионного канала виropорина.

Несмотря на очень интенсивные исследования последних двух лет, некоторые ключевые этапы жизненного цикла SARS-CoV-2 остаются плохо изученными. В частности, не ясны точные молекулярные механизмы почкования вирусных частиц. В образовании мембранных вирусных частиц есть два важнейших этапа: появление сферических выпячиваний на мембранах клетки и последующий отрыв вирусных частиц от основной

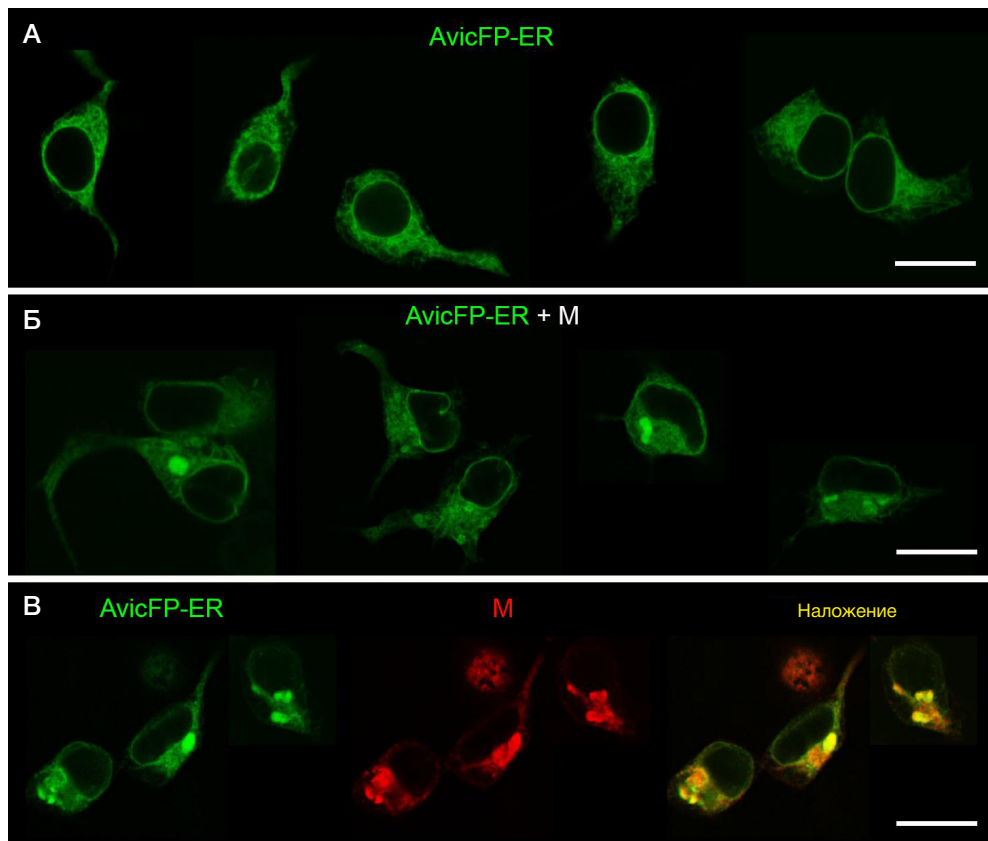


Рис. 1. Конфокальная микроскопия клеток HEK293Т, трансфицированных целевыми плазмидами. Масштабные линейки — 20 мкм. **А.** Трансфекция плазмидой, кодирующей маркер ЭПР AvicFP-ER (зеленый канал). **Б.** Котрансфекция плазмидами, кодирующими AvicFP-ER (зеленый канал) и М-белок. **В.** Котрансфекция плазмидами, кодирующими AvicFP-ER (зеленый канал) и М-белок, с последующей окраской антителами против М-белка (красный канал; справа — наложение двух каналов). Представлены коллажи из четырех (**А**), четырех (**Б**) и двух (**В**) полей зрения, показывающие типичные для каждого образца клетки

мембраны [3]. Известно множество вирусных белков, которые могут деформировать мембрану и формировать почкующийся вирион, но лишь немногие белки могут опосредовать разрыв мембраны для завершения процесса почкования. Большинство оболочечных вирусов при окончательном разрыве мембраны используют механизм клетки-хозяина — комплекс белков ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) [4]. Однако у некоторых вирусов, включая коронавирусы, на этом этапе задействованы только свои собственные белки [5, 6].

Недавно проведенное компьютерное моделирование показало, что Е-белок может как чувствовать, так и индуцировать кривизну мембраны таким образом, что его цитоплазматический С-конец предпочитает находиться на выпуклых областях мембраны [7]. Полностью сформированные вирусные частицы имеют противоположную кривизну. В то же время выпуклая кривизна появляется при почковании вируса в области шейки, соединяющей будущий вирион с хозяйской мембраной. Это может служить объяснением того, что лишь небольшое количество молекул Е-белка попадает в отпочкованный вирион, а также позволяет выдвинуть гипотезу об активном участии этого белка в образовании и, возможно, разделении перешеечной области [8].

Мы использовали флуоресцентную микроскопию клеток человека, экспрессирующих М-белок SARS-CoV-2 в качестве модельной системы. По сравнению с заражением клеток нативным вирусом, такая модель имеет следующие преимущества. Во-первых, поведение целевого белка можно изучать отдельно, без влияния остальных вирусных белков, что позволяет упростить систему и

выявить свойства индивидуальных белков. Во-вторых, отсутствие функционального вируса делает исследования безопасными с возможностью проводить их в обычной лаборатории. В-третьих, такая экспериментальная система может служить прототипом скрининговых платформ для безопасного и легко масштабируемого поиска ингибиторов функционирования целевых вирусных белков. Вместе с тем редукционистская модель экспрессии отдельных вирусных генов, безусловно, имеет существенные ограничения, и полученные результаты нуждаются в дальнейшей верификации на полных вирусных системах.

Экспрессионный вектор, кодирующий М-белок (pGBW-m4134547, AddGene plasmid #152583), был трансфицирован в культуру клеток человека HEK293Т. Для одновременной визуализации эндоплазматического ретикула (ЭПР) была использована котрансфекция с плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок mAvicFP1 с сигналом локализации на ЭПР (mAvicFP1-ER) [9]. Конфокальную микроскопию проводили на инвертированном микроскопе DMIRE2 TCS SP2 (Leica; Германия) в зеленом (возбуждение 488 нм, детекция 500–535 нм) и красном (возбуждение 543 нм, детекция 560–660 нм) каналах. Предварительные контрольные эксперименты с экспрессией mAvicFP1-ER в клетках HEK293Т показали его ожидаемую локализацию в виде ажурной сети в цитоплазме, очевидно, соответствующей ЭПР (рис. 1А). При коэкспрессии с М-белком сигнал mAvicFP1-ER претерпевал существенные изменения. Помимо сети, в большинстве клеток можно было наблюдать яркие округлые структуры размером 1–5 мкм (рис. 1Б). Дополнительная окраска антителом против М-белка

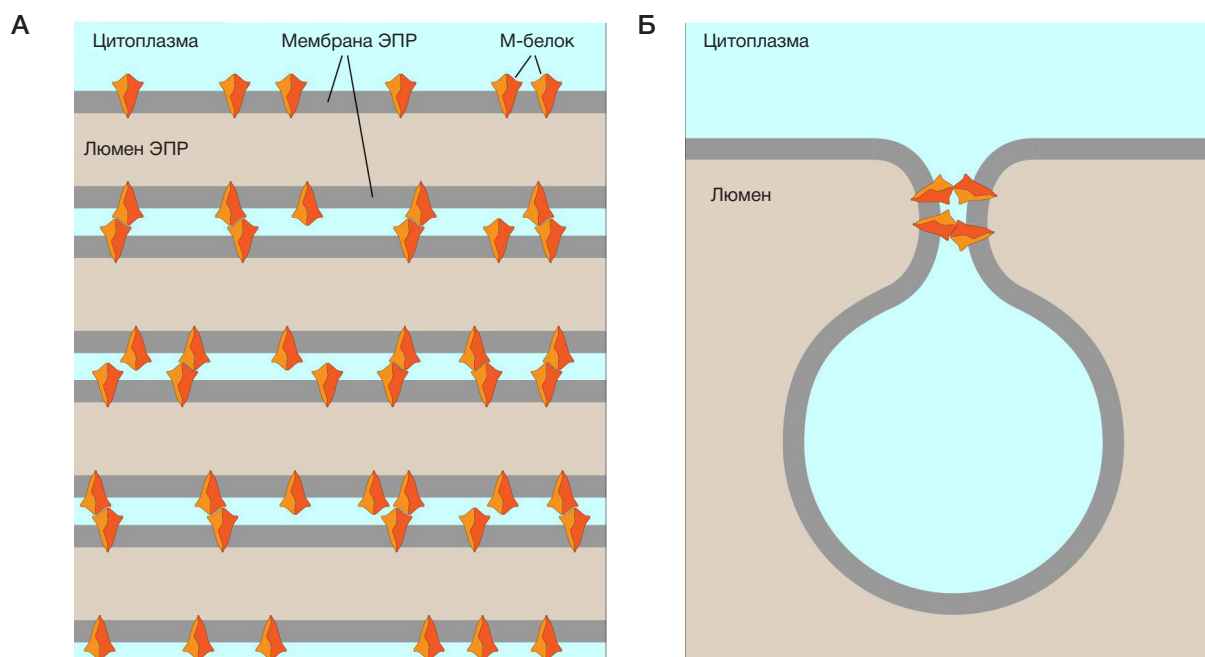


Рис. 2. Схема образования межмембранных олигомеров М-белка. **А.** Образование стопки мембран ЭПР (OSER-структур) за счет взаимодействия М-белков на соседних мембранах. **Б.** Предполагаемое участие межмембранных олигомеров М-белка в формировании перешеечной области при отшнуровывании вирусной частицы (молекулы М-белка в других областях не показаны для ясности)

(поликлональные кроличьи IgG, ABIN6952906; Antibodies-online Inc., США) и вторичными козыми антителами с красным красителем Alexa Fluor 594 (A-11012; Invitrogen, США) показала колокализацию М-белка и mAvicFP1-ER (рис. 1В). Мы сделали вывод, что М-белок локализуется на мембранах ЭПР и способен формировать из этих мембран крупные внутриклеточные скопления.

Ранее появление таких необычных структур ЭПР было описано при экспрессии олигомеризующихся белков с локализацией в мембране ЭПР, что объяснялось взаимодействием белков, связанных с параллельными мембранами ЭПР и их последующим «слипанием» в многослойные образования различной формы — так называемые OSER-структуры (organized smooth endoplasmic reticulum) [9, 10] (рис. 2А).

Известно, что М-белок формирует внутримембранные димеры [11]. Наши результаты позволяют заключить, что М-белок проявляет также тенденцию к олигомеризации между димерами, локализованными в соседних мембранах. Вероятно, в этом принимают участие С-концевые домены, экспонированные в цитозоль.

Известно, что для эффективного отделения мембранного пузырька необходимо сближение мембран в перешеечной области на расстояние 1–5 нм [12]. Размер С-концевого домена М-белка составляет около 3 нм (от поверхности мембраны) [11]. Таким образом, взаимодействия между ними сводят противоположные мембраны на дистанцию 3–6 нм. По нашему мнению, межмембранная олигомеризация М-белка является

движущей силой для сближения и слияния мембран при отшнуровывании вирусных частиц SARS-CoV-2 (рис. 2Б).

Эта гипотеза может быть в дальнейшем проверена с помощью мутагенеза аминокислотных остатков М-белка в областях возможного интерфейса межмембранного взаимодействия (наружные аминокислотные положения С-концевого домена, не вовлеченные в димеризацию). Анализ образования OSER-структур может служить способом простой оценки влияния замен на олигомеризацию. Далее, в случае подтверждения функциональной важности межмембранной олигомеризации М-белка для формирования вирусов, визуализация OSER-структур в клетках, экспрессирующих М-белок, может быть использована для безопасного высокопроизводительного скрининга веществ, ингибирующих такую олигомеризацию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы описали появление OSER-структур при экспрессии М-белка SARS-CoV-2 в клетках человека. Это указывает на наличие белок-белковых взаимодействий между молекулами М-белка, расположенными на соседних параллельных мембранах. Мы предполагаем, что межмембранные взаимодействия М-белков позволяют сформировать перешеечную область и отшнуровать вирусную частицу. В случае подтверждения этой гипотезы описанный тест на образование OSER-структур может быть использован для высокопроизводительного скрининга ингибиторов олигомеризации М-белка.

Литература

1. Yan W, Zheng Y, Zeng X, He B, Cheng W. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. *Signal Transduct Target Ther*. 2022; 7: 26.
2. Putlyaeva LV, Lukyanov KA. Studying SARS-CoV-2 with Fluorescence Microscopy. *Int J Mol Sci*. 2021; 22.
3. Rossman JS, Lamb RA. Viral membrane scission. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2013; 29: 551–69.
4. Barnes J, Wilson DW. Seeking Closure: How Do Herpesviruses Recruit the Cellular ESCRT Apparatus? *J Virol*. 2019; 93.
5. Rossman JS, Jing X, Leser GP, Lamb RA. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*. 2010; 142: 902–13.
6. J Alsaadi EA, Jones IM. Membrane binding proteins of coronaviruses. *Future Virol*. 2019; 14: 275–86.
7. Kuzmin A, Orekhov P, Astashkin R, Gordeliy V, Gushchin I. Structure and dynamics of the SARS-CoV-2 envelope protein monomer. *Proteins*. 2022; 90: 1102–14.
8. Venkatagopalan P, Daskalova SM, Lopez LA, Dolezal KA, Hogue BG. Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. *Virology*. 2015; 478: 75–85.
9. Costantini LM, Fossati M, Francolini M, Snapp EL. Assessing the tendency of fluorescent proteins to oligomerize under physiologic conditions. *Traffic*. 2012; 13: 643–9.
10. Snapp EL, Hegde RS, Francolini M, Lombardo F, Colombo S, Pedrazzini E, et al. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J Cell Biol*. 2003; 163: 257–69.
11. Monje-Galvan V, Voth GA. Molecular interactions of the M and E integral membrane proteins of SARS-CoV-2. *Faraday Discuss*. 2021; 232: 49–67.
12. Campelo F, Malhotra V. Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Annu Rev Biochem*. 2012; 81: 407–27.

References

1. Yan W, Zheng Y, Zeng X, He B, Cheng W. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. *Signal Transduct Target Ther*. 2022; 7: 26.
2. Putlyaeva LV, Lukyanov KA. Studying SARS-CoV-2 with Fluorescence Microscopy. *Int J Mol Sci*. 2021; 22.
3. Rossman JS, Lamb RA. Viral membrane scission. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2013; 29: 551–69.
4. Barnes J, Wilson DW. Seeking Closure: How Do Herpesviruses Recruit the Cellular ESCRT Apparatus? *J Virol*. 2019; 93.
5. Rossman JS, Jing X, Leser GP, Lamb RA. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*. 2010; 142: 902–13.
6. J Alsaadi EA, Jones IM. Membrane binding proteins of coronaviruses. *Future Virol*. 2019; 14: 275–86.
7. Kuzmin A, Orekhov P, Astashkin R, Gordeliy V, Gushchin I. Structure and dynamics of the SARS-CoV-2 envelope protein monomer. *Proteins*. 2022; 90: 1102–14.
8. Venkatagopalan P, Daskalova SM, Lopez LA, Dolezal KA, Hogue BG. Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. *Virology*. 2015; 478: 75–85.
9. Costantini LM, Fossati M, Francolini M, Snapp EL. Assessing the tendency of fluorescent proteins to oligomerize under physiologic conditions. *Traffic*. 2012; 13: 643–9.
10. Snapp EL, Hegde RS, Francolini M, Lombardo F, Colombo S, Pedrazzini E, et al. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J Cell Biol*. 2003; 163: 257–69.
11. Monje-Galvan V, Voth GA. Molecular interactions of the M and E integral membrane proteins of SARS-CoV-2. *Faraday Discuss*. 2021; 232: 49–67.
12. Campelo F, Malhotra V. Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Annu Rev Biochem*. 2012; 81: 407–27.

НОВАЯ СТРАТЕГИЯ ПОИСКА ГОРМОНАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ЭНДОМЕТРИЯ У ПАЦИЕНТОК В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

Г. М. Савельева, В. Г. Бреусенко, Е. Н. Карева, Г. Н. Голухов, Д. С. Гуторова [✉], А. В. Овчинникова, Т. Н. Ивановская, К. В. Щербатюк

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

Причины неэффективности гормональной терапии пролиферативных процессов эндометрия (ППЭ) в постменопаузе остаются неясными. Влияние гормональной терапии ППЭ на активность иммунной системы достаточно не изучено. Целью работы было на основании результатов исследования экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани эндометрия, клетках мононуклеарной фракции периферической крови (МНФК) определить целесообразность и возможность назначения гормональной терапии ППЭ у пациенток в постменопаузе. Обследовали 92 пациентки в постменопаузе с ППЭ: с железисто-фиброзными полипами — 37; с гиперплазией без атипии (ГЭ) — 7; атипической гиперплазией (АГЭ) — 8; умереннодифференцированной аденокарциномой — 31; высокодифференцированной аденокарциномой — 9. В МНФК и образцах ткани эндометрия исследовали экспрессию ERα, ERβ, mER, PRA, PRB, mPR, PGRmC1 методом РТ-ПЦР. В эксперименте определяли изменение рецепторного профиля МНФК после инкубации клеток с прогестероном и мифепристоном у пациенток с полипами эндометрия и здоровых женщин. При анализе результатов в ткани ГЭ обнаружен высокий уровень ERα, ERβ, PRA, PRB, mPR, PGRmC1. В МНФК при АГЭ выявлен высокий уровень mER, ERα, PRA. Это может свидетельствовать о подавлении функции моноцитов, макрофагов, Т-лимфоцитов и натуральных киллеров. При аденокарциноме эндометрия рецепторный транскриптом в МНФК не нарушен, что может означать развитие автономности опухоли. В исследовании *in vitro* мифепристон снижает экспрессию ERα, ERβ, mPR, PGRmC1, PRA, PRB в МНФК у пациенток с полипами эндометрия. На наш взгляд, это нивелирует негативное действие половых стероидных гормонов на иммунокомпетентные клетки.

Ключевые слова: пролиферативные процессы эндометрия, гиперплазия эндометрия, постменопауза, гормональная терапия, ERα, ERβ, mER, PRA, PRB, mPR, PGRmC1

Финансирование: работа выполнена в рамках научно-исследовательской работы «Молекулярно-фармакологические маркеры рецидивирования пролиферативных процессов тканей репродуктивного тракта у пациенток постменопаузального возраста» ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России 2018–2020 гг. УДК 577.21 Рег. № НИОКТР АААА-А18-118051590095-4 Рег. № ИКРБС АААА-Б20-220100690049-5.

Вклад авторов: Г. М. Савельева — дизайн и руководство исследованием; В. Г. Бреусенко — руководство клинической частью исследования; Е. Н. Карева — руководство и проведение лабораторной части исследования, анализ полученных лабораторных данных; Г. Н. Голухов — консультирование, анализ результатов, редактирование статьи; Д. С. Гуторова — выполнение всей работы, сбор базы данных, статистическая обработка, анализ полученных результатов, написание статьи; А. В. Овчинникова — помощь в статистической обработке материала; Т. Н. Ивановская — анализ части историй болезни; К. В. Щербатюк — дополнение базы данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол № 210 от 30 августа 2021 г.). Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Дина Сергеевна Гуторова
ул. Лобачевского, д. 42, г. Москва, 119415, Россия; gutorova-d@rambler.ru

Статья получена: 18.05.2022 **Статья принята к печати:** 13.06.2022 **Опубликована онлайн:** 28.06.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.036

A NEW STRATEGY IN SELECTION OF HORMONE THERAPY FOR ENDOMETRIAL PROLIFERATIVE PROCESS IN POSTMENOPAUSAL PATIENTS

Savelyeva GM, Breusenko VG, Kareva EN, Golukhov GN, Gutorova DS [✉], Ovchinnikova AV, Ivanovskaya TN, Shcherbatyuk KV

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The limited efficacy of hormone therapy for endometrial proliferative process (EPP) in postmenopausal patients and its side effects on the immune system functionalities have not been studied in detail. Here we assess the feasibility of hormone therapy for EPP in postmenopausal patients through evaluation of estradiol and progesterone receptor gene expression in endometrial tissue and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The study enrolled 92 postmenopausal patients with EPP, including 37 pts with glandular-fibrous polyps, 7 pts with non-atypical endometrial hyperplasia (EH), 8 pts with atypical endometrial hyperplasia (AEH), 31 pts with moderately differentiated adenocarcinoma and 9 pts with highly differentiated adenocarcinoma. The PBMC isolates and endometrial samples were tested for ERα, ERβ, mER, PRA, PRB, mPR and PGRmC1 expression by reverse real time polymerase chain reaction (RT-PCR). Differential changes in PBMC receptor profiles upon *in vitro* exposure to progesterone or mifepristone were determined for patients with endometrial polyps and healthy women. The results indicate elevated expression of ERα, ERβ, PRA, PRB, mPR and PGRmC1 by endometrial tissues in EH and elevated expression of mER, ERα and PRA by PBMC in AEH, apparently reflecting suppressed functionalities of monocytes, macrophages, T-cells and natural killer cells. Unaltered expression of the studied genes by PBMC in endometrial adenocarcinoma may reflect the incrementing tumor autonomy. *In vitro*, mifepristone inhibited ERα, ERβ, mPR, PGRmC1, PRA and PRB expression in PBMC isolated from patients with endometrial polyps. We suppose that such effects can mitigate the negative influence of sex steroid hormones on immunocompetent cells.

Keywords: endometrial proliferative process, endometrial hyperplasia, postmenopause, hormonal therapy, ERα, ERβ, mER, PRA, PRB, mPR, PGRmC1

Funding: the study was carried out as a part of "Molecular pharmacological markers of recurrence for proliferative processes of the reproductive tract tissues in postmenopausal patients" 2018–2020 research project at the Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Healthcare of Russia (universal decimal classifier 577.21; R&D No. АААА-А18-118051590095-4; info reg. ID No. АААА-Б20-220100690049-5)

Author contribution: Savelyeva GM — design and supervision; Breusenko VG — clinical supervision; Kareva EN — laboratory supervision, laboratory tests and analysis of the data; Golukhov GN — consulting, data interpretation, manuscript editing; Gutorova DS — concept, patient database construction, statistical processing, analysis and interpretation of the data, manuscript writing; Ovchinnikova AV — statistical processing of the data; Ivanovskaya TN — formal analysis; Shcherbatyuk KV — patient data management.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review Board at the Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 210 of 30 August 2021). All patients provided voluntary informed consent for the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dina S. Gutorova
Lobachevskogo, 42, Moscow, 119415, Russia; gutorova-d@rambler.ru

Received: 18.05.2022 **Accepted:** 13.06.2022 **Published online:** 28.06.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.036

Рак эндометрия занимает второе место по распространенности среди всех онкологических заболеваний [1]. В возрастной группе 65–69 лет показатель заболеваемости наивысший — 98,1 случай на 100 тыс. женщин соответствующего возраста. Аденокарцинома эндометрия является наиболее распространенным вариантом рака тела матки. Это гормонозависимое заболевание, которое нередко развивается на фоне пролиферативных процессов эндометрия (ППЭ) [2]. Гормональная терапия не является высокоэффективным методом лечения рака эндометрия, и ее проводят в исключительных случаях — у молодых пациенток с начальной стадией высокодифференцированного рака тела матки. При атипической гиперплазии эндометрия рекомендуется также оперативное лечение в связи с большой вероятностью развития (40–60%) сопутствующей аденокарциномы эндометрия у этих пациенток [3]. Несмотря на то что эффективность терапии гиперплазии эндометрия без атипии может достигать 100%, для достижения этого гестагенные препараты должны напрямую и длительно воздействовать на эндометрий (левоноргестерелсодержащая внутриматочная система) [4, 5]. Эффективность пероральных форм препаратов составляет 50–69% [6]. Большой ответ на гестагенную терапию в виде внутриматочной системы, вероятно, может быть связан с ее низким системным влиянием.

В поисках причины отсутствия успеха гормональной терапии ученые исследовали экспрессию про- и антиапоптотических белков, рецептивность эндометрия в целом и различия экспрессии рецепторов в железах / строме эндометрия [7–11]. Однако убедительных результатов на уровне ткани получено не было. Чувствительность ткани к гормональному влиянию была высокой, но ее системному действию не уделялось должного внимания. Нет данных о влиянии гормональной терапии ППЭ на активность иммунной системы, которая имеет принципиальное значение. Имеются сведения об отсутствии связи вида патологии эндометрия с составом иммунокомпетентных клеток, однако не оценена их функциональная активность [12].

В молекулярно-биологических исследованиях было показано, что гормональные средства (эндогенные гормоны и лекарственные препараты) влияют на функцию иммунокомпетентных клеток за счет связывания со специфическими типами рецепторов [13]. Для разных иммунокомпетентных клеток характерно преобладание определенных типов рецепторов в них [13]. Однако данные исследования проводили у здоровых доноров крови, часто без учета возраста.

Целью нашей работы было определение целесообразности и возможности назначения гормональной терапии ППЭ у пациенток в постменопаузе на основании результатов исследования экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани эндометрия, клетках МНФК, а также исследование *in vitro* влияния гормональных препаратов на рецепторный профиль МНФК как критерия их функциональной активности.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили с 2012 по 2021 г. на базе кафедры акушерства и гинекологии п/ф РНИМУ им. Н. И. Пирогова (ГКБ № 31). Часть материала была взята в онкогинекологическом отделении онкодиспансера № 1 г. Москвы. В исследовании участвовали 92 пациентки. Основную группу составили 55 пациенток в постменопаузе

с различными вариантами ППЭ: гиперплазией эндометрия без атипии — 7, атипической гиперплазией — 8, аденокарциномой — 40 (умереннодифференцированной — 31, высокодифференцированной — 9). В группу сравнения вошли 37 больных с полипами эндометрия, в связи с их низкой пролиферативной активностью (при гистологическом исследовании верифицирован железисто-фиброзный полип эндометрия). При изучении экспрессии генов рецепторов в мононуклеарах периферической крови дополнительно была сформирована контрольная группа, в которую были включены 10 здоровых женщин периода постменопаузы без гинекологической патологии. Ее составили сотрудники РНИМУ Н. И. Пирогова и ГКБ № 31 без клинических проявлений ППЭ. Отсутствие патологии эндометрия и других гинекологических заболеваний было подтверждено данными УЗИ малого таза. У здоровых женщин были взяты образцы крови.

Критерии включения пациенток: наличие патологии эндометрия по данным патоморфологического метода исследования образцов ткани эндометрия; период постменопаузы. Согласно критериям классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2014 г., гистологические препараты были верифицированы как гиперплазия эндометрия без атипии, атипическая гиперплазия эндометрия, аденокарцинома эндометрия (умереннодифференцированная, высокодифференцированная), полип эндометрия (железисто-фиброзный вариант).

Критерии исключения из исследования основной группы, группы сравнения, а также контрольной группы: прием гормональных препаратов (эстроген-гестагены, гестагены, агонисты гонадотропин-релизинг-гормона, заместительная гормональная терапия и тамоксифен) в течение 6 месяцев до проведения исследования, гинекологические заболевания (миома матки размерами более 6–7 недель беременности, опухоли яичников), воспалительные процессы различной локализации на момент взятия образцов.

Возраст пациенток, основной, контрольной и группы сравнения колебался от 53 до 80 лет, в среднем составил $64,2 \pm 6,27$ лет. Длительность периода постменопаузы была различной и зависела от возраста.

Причиной поступления в стационар было наличие патологии эндометрия по данным УЗИ малого таза у 60 (65,22%) пациенток. Кровяные выделения из половых путей были у 32 (34,78%) пациенток.

Из сопутствующей гинекологической патологии наиболее часто (63,04%) встречалась миома матки малых размеров в стадии регресса. Патология эндометрия в анамнезе (полипы, гиперплазия эндометрия без атипии) в различные периоды жизни диагностирована у 28,26% пациенток.

Среди экстрагенитальной патологии гипертоническая болезнь была выявлена у 80,43%, ишемическая болезнь сердца — у 72,82%, избыточный вес различной степени выраженности — у 90,2% пациенток.

Всем пациенткам проводили стандартное обследование, включая УЗИ по стандартной методике на аппарате LOGIC E9 (GE; США) с использованием внутриматочного микроконвексного датчика 4–10 МГц. У всех наблюдаемых выявлено увеличение толщины эндометрия (М-ЭХО) более 4 мм, отмечена неоднородность эхоструктуры и наличие гиперэхогенных включений.

Гистероскопия, раздельное диагностическое выскабливание слизистой матки было проведено у 55 (59,78%)

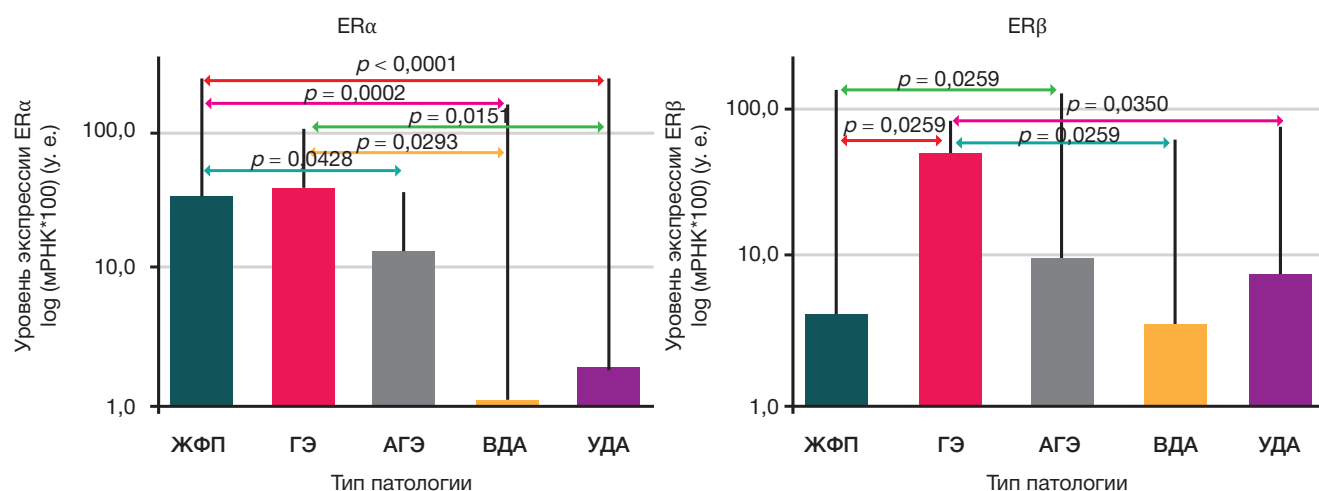


Рис. 1. Экспрессия генов ядерных рецепторов эстрадиола в ткани эндометрия у пациенток с пролиферативными процессами эндометрия в постменопаузе. Ось ординат: lg уровня мРНК $(1/2 - \Delta Ct) \times 10^2$, ген сравнения GAPDH; ГЭ — гиперплазия эндометрия без атипии, АГЭ — атипичная гиперплазия эндометрия, УДА — умереннодифференцированная аденокарцинома, ВДА — высокодифференцированная аденокарцинома, ЖФП — железисто-фиброзный полип эндометрия; p — уровень статистической значимости

пациенток, из них у 16 — резекция или абляция эндометрия. Экстирпацию матки с придатками выполнили у 37 (40,22%) пациенток: лапаротомическим доступом — у 30, лапароскопическим — у 6 и влагалищным — у 1.

До проведения оперативного лечения были взяты образцы крови. Получение мононуклеаров из периферической крови осуществляли методом Boum [14]. Биоптаты ткани эндометрия зеркально разделяли на две равные части: для проведения исследования экспрессии генов рецепторов половых стероидов и для гистологического исследования. Ткань эндометрия помещали в криопроводки Thermo scientific nunc Cryo Tube Vials 1,5 мл, маркировали и замораживали в жидком азоте. Выделение мРНК из ткани эндометрия проводили с помощью набора «Рибо-преп» (Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; Россия) согласно инструкции производителя. В ткани эндометрия и клетках МНФК исследовали экспрессию генов рецепторов эстрадиола (ERα, ERβ, mER) и прогестерона (PRA, PRB, mPR, PGRmC1). Выделение мРНК, проведение реакции обратной транскрипции и анализ количества ДНК проводили стандартными методами полимеразной цепной реакции в реальном времени iCycler iQ real-time PCR (BioRad; Германия). В качестве гена сравнения использовали ген GAPDH (глицеральдегидфосфатдегидрогеназы).

Для оценки числа копий мРНК применяли ΔCt метод относительного определения количества по формуле $(1/2)^{\Delta Ct}$, где $\Delta Ct = Ct(mER) - Ct(GAPDH)$ и $2 \times (-\Delta \Delta Ct)$, где $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct$ (при патологии) — ΔCt (контрольная ткань).

Дополнительно было проведено исследование *in vitro*, где определяли влияние гестагенных препаратов на экспрессию генов рецепторов половых стероидных гормонов в мононуклеарах периферической крови. Для этого мононуклеары периферической крови здоровых женщин и женщин с полипами эндометрия инкубировали с прогестероном, мифепристоном (конечная концентрация в инкубационной среде составила 10^{-8} М) и без использования препаратов в качестве группы контроля. После инкубирования определяли экспрессию генов рецепторов эстрадиола и прогестерона по описанной выше методике.

Определение жизнеспособности МНФК проводили методом МТТ-теста после инкубации с гестагенными препаратами [15].

В результате анализа историй болезни пациенток с ППЭ была сформирована база исследования с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel 7,0 (Microsoft; США) для Windows 2007 (Microsoft; США) и Numbers версия 4.3 (5046) (Apple; США) для MacBook Pro 2013 (Apple; США). При анализе результатов осуществляли сравнение качественных и количественных признаков,

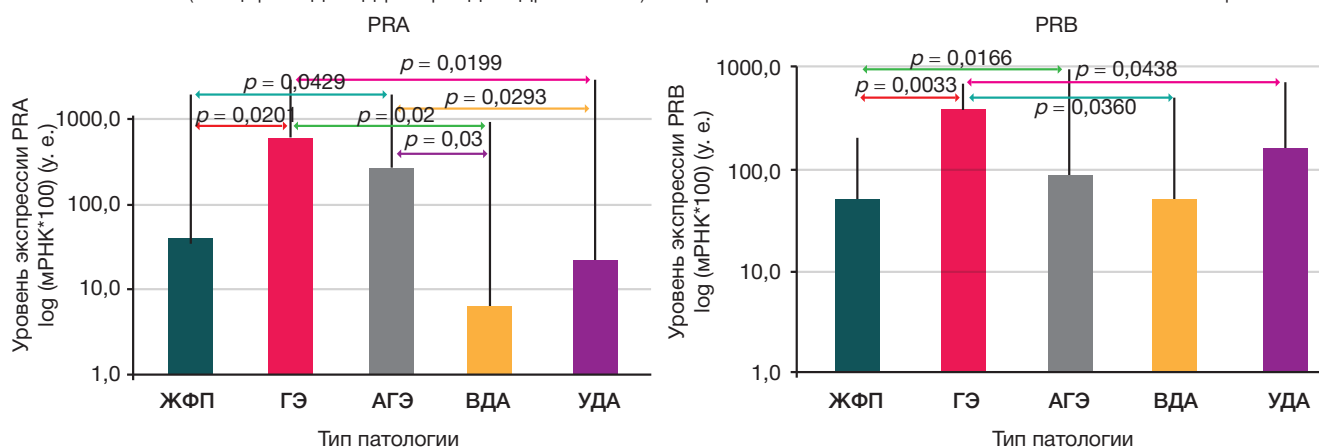


Рис. 2. Экспрессия генов ядерных рецепторов прогестерона в ткани эндометрия у пациенток с пролиферативными процессами эндометрия в постменопаузе. Ось ординат: lg уровня мРНК $(1/2 - \Delta Ct) \times 10^2$, ген сравнения GAPDH; ГЭ — гиперплазия эндометрия без атипии, АГЭ — атипичная гиперплазия эндометрия, УДА — умереннодифференцированная аденокарцинома, ВДА — высокодифференцированная аденокарцинома, ЖФП — железисто-фиброзный полип эндометрия; p — уровень статистической значимости

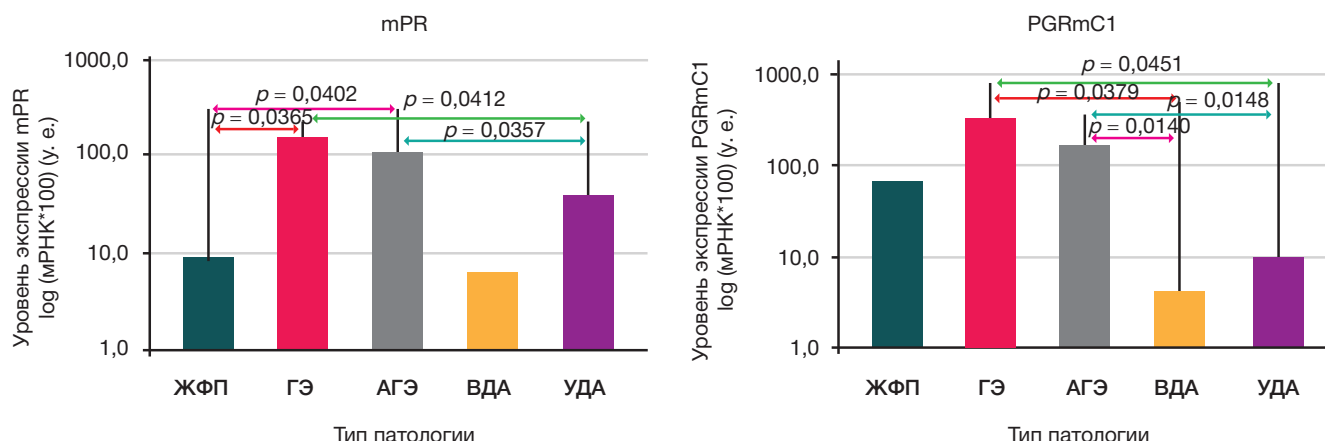


Рис. 3. Экспрессия генов мембранных рецепторов прогестерона в ткани эндометрия у пациенток с пролиферативными процессами эндометрия в постменопаузе. Ось ординат: lg уровня мРНК $(1/2-\Delta Ct) \times 10^2$, ген сравнения GAPDH; ГЭ — гиперплазия эндометрия без атипии, АГЭ — атипичная гиперплазия эндометрия, УДА — умереннодифференцированная аденокарцинома, ВДА — высокодифференцированная аденокарцинома, ЖФП — железисто-фиброзный полип эндометрия; p — уровень статистической значимости

характерных для изучаемых групп. Статистическую обработку и построение диаграмм проводили с помощью программного пакета GraphPad Prism версия 5.0 (GraphPad Software; США) и программного пакета STATISTICA 8 (StatSoftInc; США). Обработку данных выполняли с использованием критериев Фишера и Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия с вероятностью не менее 95% или $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам проведенного исследования, экспрессия генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани эндометрия зависит от характера патологии эндометрия.

Как было опубликовано ранее [16], высокие показатели экспрессии генов рецепторов эстрадиола ER α , ER β характерны для ткани гиперплазии эндометрия и низкие — для ткани аденокарциномы эндометрия (рис. 1).

При анализе экспрессии генов ядерных рецепторов прогестерона [16] мы выявили их высокий уровень в ткани гиперплазии эндометрия с атипией и без нее (рис. 2). Уровни экспрессии PRA и PRB между группами пациенток схожи, однако различаются при сравнении показателей у пациенток с аденокарциномой и АГЭ. Мы выявили ожидаемое резкое снижение экспрессии PRA в ткани аденокарциномы ниже показателей АГЭ, однако уровень экспрессии PRB не достиг таких низких значений.

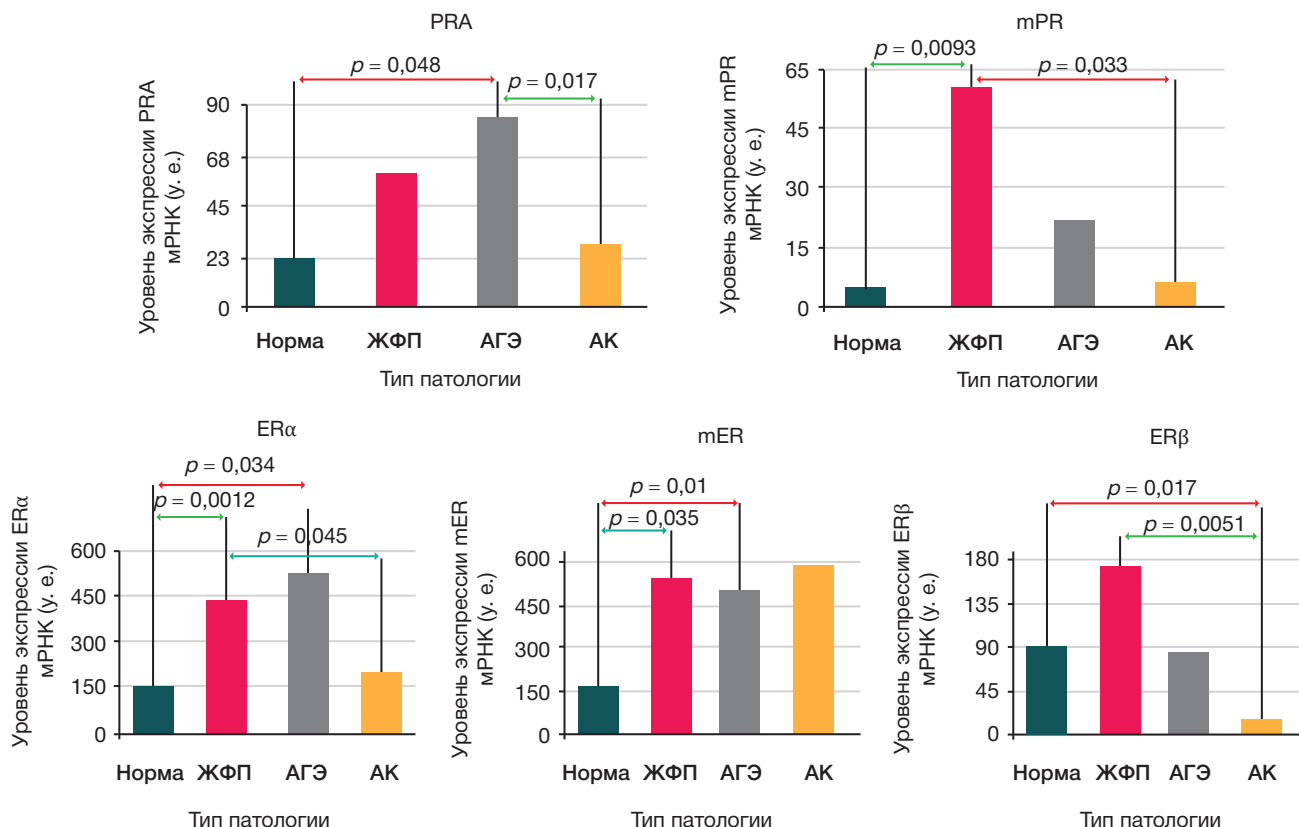


Рис. 4. Экспрессия генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в мононуклеарах периферической крови у пациенток с пролиферативными процессами эндометрия в постменопаузе. Ось ординат: lg уровня мРНК $(1/2-\Delta Ct) \times 10^4$, ген сравнения GAPDH; норма — здоровые женщины постменопаузального периода, ЖФП — железисто-фиброзный полип эндометрия, АГЭ — атипичная гиперплазия эндометрия, АК — аденокарцинома, p — уровень статистической значимости

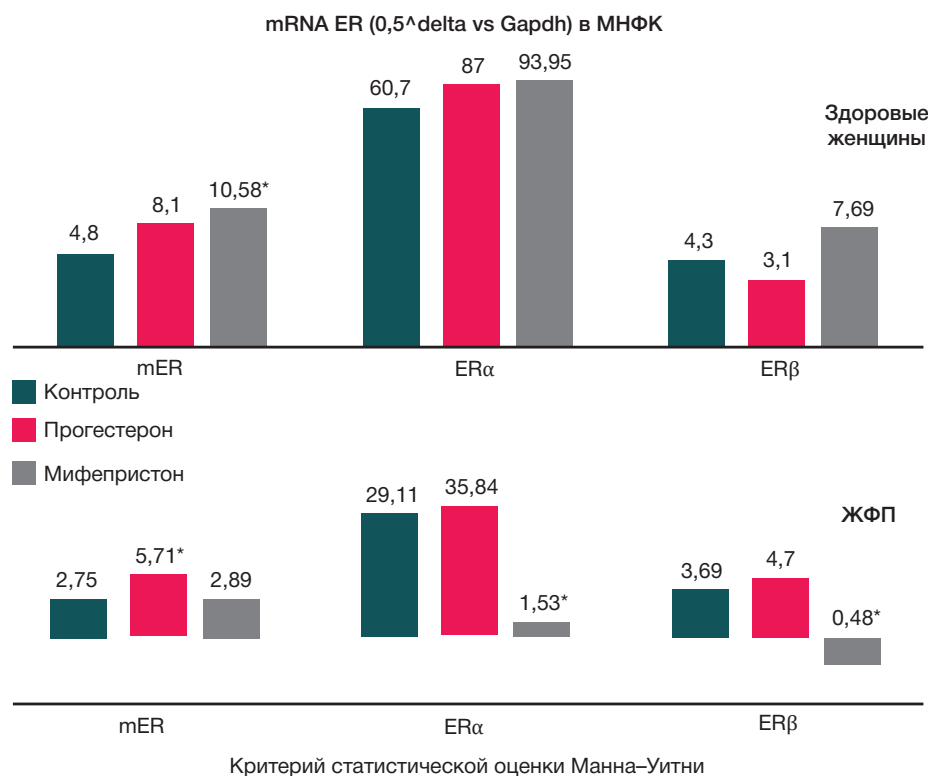


Рис. 5. Экспрессия генов рецепторов эстрадиола в МНФК после инкубации *in vitro* с прогестероном и мифепристоном. Ось ординат: уровень мРНК ($1/2-\Delta\Delta$) $\times 100$, ген сравнения GAPDH; ось абсцисс: тип рецептора; ЖФП — железисто-фиброзный полип эндометрия. * — $p \leq 0,05$ относительно контроля

Отмечен высокий уровень экспрессии mPR в ткани ГЭ без и с атипией (рис. 3). Показатели экспрессии PGRmC1 были низкими в ткани аденокарциномы эндометрия (рис. 3).

Как опубликовано ранее [17], в МНФК мы определили высокий уровень экспрессии mER, ERα, PRA при АГЭ по сравнению со здоровыми женщинами (рис. 4). Экспрессия ERβ в МНФК при аденокарциноме эндометрия была достоверно ниже показателей контрольной группы.

При сопоставлении экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона в ткани эндометрия и МНФК

мы выявили совпадение профилей рецепторов ERα и PRA (рис. 1, 2, 4).

В исследовании *in vitro* инкубация МНФК здоровых женщин как с мифепристоном, так и прогестероном, увеличивала экспрессию генов рецепторов эстрадиола и прогестерона (рис. 5, 6).

У пациенток с полипами эндометрия инкубация МНФК с прогестероном приводила к повышению экспрессии mER, mPR, PGRmC1. При инкубации с мифепристоном обнаружено снижение экспрессии ERα, ERβ, mPR, PGRmC1, PRA, PRB.

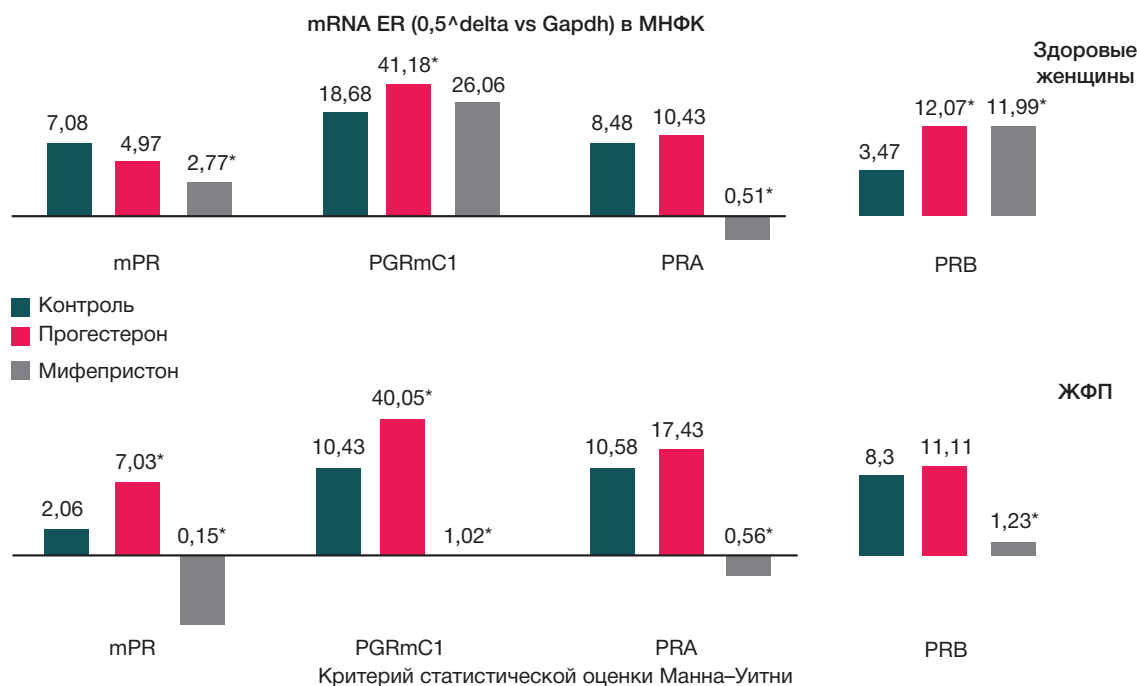


Рис. 6. Экспрессия генов рецепторов прогестерона в МНФК после инкубации *in vitro* с прогестероном и мифепристоном. Ось ординат: уровень мРНК ($1/2-\Delta\Delta$) $\times 100$, ген сравнения GAPDH; ось абсцисс: тип рецептора; ЖФП — железисто-фиброзный полип эндометрия. * — $p \leq 0,05$ относительно контроля

При изучении жизнеспособности клеток методом МТТ-теста при инкубации с мифепристоном мы определили, что он снижает количество живых пролиферирующих, активно продуцирующих цитокины иммуннокомпетентных клеток ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С целью подбора гормональной терапии пациенткам периода постменопаузы с ППЭ необходимо понимание рецепторного статуса ткани эндометрия. При низких значениях экспрессии рецепторов ответ ткани на гормональное воздействие не будет достигать терапевтических значений [4, 6, 7]. Однако у ряда пациенток периода постменопаузы отсутствует эффект от проводимой терапии и возникают рецидивы заболевания при высоком уровне экспрессии рецепторов. Причина этого не ясна, и необходимы дальнейшие исследования.

Основные рецепторы, посредством которых эстрогены реализуют свое пролиферативное действие в ткани эндометрия, — ER α и ER β [18]. При этом главную роль играет ER α . Выявленные нами высокие показатели экспрессии ER α , ER β (рис. 1) в ткани гиперплазии эндометрия с атипией и без нее могут свидетельствовать о потенциальной эффективности ингибиторов ароматазы (блок синтеза эстрогенов) у пациенток в постменопаузе.

В сравнении с показателями контрольной группы более высокий уровень экспрессии ER β в ткани гиперплазии эндометрия с атипией и без нее (рис. 1) свидетельствует об участии данного рецептора в патогенезе ППЭ. Известно, что ER β может проводить как пролиферативный, так и антипролиферативный сигнал эстрогенов. Это служит потенциальной мишенью для лекарственной терапии и обосновывает необходимость разработки новых препаратов — селективных лигандов ER β . По литературным данным, при исследовании экспрессии ER α и ER β в ткани аденокарциномы эндометрия показана связь повышения экспрессии ER β с более агрессивными вариантами аденокарциномы эндометрия [18], что подтверждает нашу гипотезу о более важной роли ER β в патогенезе ППЭ. Другие авторы отмечали высокий уровень экспрессии ядерных рецепторов эстрадиола в ткани гиперплазии эндометрия при исследовании методом иммуногистохимии [19]. Однако они проводились в смешанных по возрасту группах.

Выявленный нами высокий уровень экспрессии ядерных рецепторов прогестерона в ткани гиперплазии эндометрия с атипией и без нее (рис. 2) может быть компенсаторным механизмом при развитии пролиферативного процесса. Это свидетельствует о недостаточности эндогенного гестагена и патогенетически обосновывает назначение синтетических гестагенов при данной патологии эндометрия. Однако тот факт, что уровень экспрессии PRB в ткани аденокарциномы эндометрия не достиг резкого снижения, как PRA, и его уровень сопоставим с показателями экспрессии в ткани АГЭ, может отражать неравноценное участие PRA и PRB в патогенезе АГЭ, что подтверждают данные других авторов [20]. Известно, что PRB в отсутствие PRA может способствовать пролиферации ткани [21]. В связи с этим, при преобладании экспрессии PRB в ткани гиперплазии эндометрия логично ожидать отсутствие подавляющего действия прогестерона на ткань гиперплазии эндометрия. Назначение гестагенных препаратов в этом случае может приводить либо к неэффективности терапии

либо к прогрессии заболевания. Указанное требует проведения индивидуального анализа рецепторного профиля удаленной ткани эндометрия перед назначением синтетических гестагенов. При высоких показателях PRA назначение гестагенных препаратов возможно, в то время как при высоких показателях экспрессии PRB назначение гестагенов сомнительно.

Мембранный рецептор прогестерона mPR может потенцировать проведение сигнала PRB, обуславливая его эффекты, и самостоятельно способствовать прогрессии аденокарциномы эндометрия [22]. mPR и PRB реализуют пролиферативную активность гестагенов в клетках-мишенях. Следовательно, выявленный нами высокий уровень экспрессии mPR в ткани ГЭ без и с атипией (рис. 3) может быть неблагоприятным фактором наряду с высокими показателями PRB.

В ткани аденокарциномы эндометрия пониженная рецепция прогестерона (PRA, mPR, PGRmC1) объясняет низкую эффективность гормональной терапии у этих больных и согласуется с известным фактом, что назначение гормональной терапии при аденокарциноме эндометрия целесообразно после определения экспрессии рецепторов в ткани [11].

Известно, что пролиферативные процессы контролирует иммунная система. При ее нарушении процесс может принять неуправляемый характер и привести к злокачественной трансформации ткани. Доказано, что половые стероидные гормоны влияют на функцию иммуннокомпетентных клеток через собственные рецепторы [13]. Однако работ, посвященных исследованию экспрессии рецепторов эстрадиола и прогестерона в МНФК при ППЭ, нам неизвестно.

В проведенной работе мы обнаружили нарушение чувствительности МНФК к стероидам, что свидетельствует об изменении их функциональной активности, так как известно, что клеточный состав белой крови при ППЭ не меняется [12]. Кроме того, для разных видов мононуклеаров крови характерно преобладание определенных типов рецепторов [13], что позволяет нам на основании полученных результатов косвенно судить об изменении функции иммуннокомпетентных клеток.

ER α является основным типом рецептора эстрадиола в моноцитах / макрофагах и Т-хелперах. Эстрадиол подавляет моноцитарно-макрофагальное и стимулирует Т-хелперное звено иммунитета [23, 24]. Выявленные нами высокие показатели экспрессии ER α в МНФК при АГЭ (рис. 4) свидетельствуют о повышенной чувствительности клеток к подавляющему действию эстрадиола на моноцитарно-макрофагальное и стимулирующему на Т-хелперное звено иммунитета. Подобное стимулирование Т-клеточного иммунного ответа, согласно литературным данным, приводит к активации макрофагов и стимулирует выработку провоспалительных цитокинов [23, 24], что объясняет персистенцию хронического воспалительного процесса как одного из патогенетических механизмов развития злокачественной опухоли.

В Т-киллерах, представляющих первый этап борьбы с опухолевой прогрессией, практически полностью отсутствуют ядерные рецепторы эстрадиола, но известно, что эстрогены подавляют активность Т-киллеров [24]. Указанное свидетельствует о проведении сигнала эстрогенов именно посредством мембранного рецептора mER. Следовательно, выявленное нами повышение чувствительности мононуклеаров при АГЭ (рис. 4) может способствовать сохранению клона атипических клеток в ткани эндометрия.

В МНФК PRA выявлен исключительно в натуральных киллерах и через него прогестерон подавляет секрецию цитокинов [25]. Обнаруженный нами высокий уровень экспрессии PRA в натуральных киллерах (рис. 4) потенцирует прогрессию атипической гиперплазии эндометрия.

Таким образом, при атипической гиперплазии эндометрия подавлена функция моноцитов, макрофагов, Т-лимфоцитов и натуральных киллеров. Это можно объяснить следующим образом: гиперэкспрессия рецепторов приводит к высокой чувствительности мононуклеаров к гормонам (эндогенным и фармакологическим средствам), что в свою очередь приводит к подавлению функции иммунокомпетентных клеток. В связи с указанным процесс становится неконтролируемым, что может быть причиной озлокачивания ткани АГЭ. Этим можно объяснить недостаточную эффективность (а иногда и опасность назначения) гормональной терапии пациенткам периода постменопаузы с АГЭ.

В отличие от АГЭ при аденокарциноме уровень экспрессии генов рецепторов ER α , PRA, mPR в МНФК соответствует показателям здоровых женщин (рис. 4), что неожиданно, так как логично было бы прогрессивное снижение функции иммунитета. Представленность ER α и PRA в МНФК описана выше. Согласно литературным данным, mPR является основным типом рецепторов в Т-лимфоцитах и в моноцитах / макрофагах [26]. Следовательно, по нашим данным, рецепторный транскриптом моноцитов, макрофагов, Т-лимфоцитов и натуральных киллеров не нарушен при аденокарциноме эндометрия у пациенток в постменопаузе. Указанное может свидетельствовать об ускользании злокачественной опухоли из-под контроля иммунной системы.

Неожиданные изменения в иммунном статусе выявлены в отношении рецептора ER β (рис. 4). Данный рецептор реализует сигнал эстрогена в В-лимфоцитах [27]. Уровень его экспрессии, по нашим данным (рис. 4), резко снижен при аденокарциноме эндометрия ниже показателей контрольной группы. Это, на наш взгляд, свидетельствует не столько о потере чувствительности опухоли к внешним сигналам (так как в этой ситуации скорее можно было бы ожидать значений экспрессии рецепторов, близких к нормальным), сколько о вторичном подавлении опухоли В-клеточного звена иммунитета.

При сопоставлении показателей экспрессии генов рецепторов в ткани эндометрия и МНФК мы выявили совпадение профилей ER α и PRA. При аденокарциноме эндометрия это может свидетельствовать о маскировании опухоли как от прямого влияния гормонов на ткань, так и от действия иммунной системы на нее. Следовательно, назначение гормональной терапии пациенткам периода постменопаузы с аденокарциномой эндометрия нецелесообразно.

При АГЭ высокий уровень экспрессии PRA (рис. 2, 4) в ткани эндометрия и мононуклеарах говорит о повышенной чувствительности к гестагенам, что в случае МНФК способствует сохранению клона атипических клеток.

Таким образом, фармакологическая стратегия в лечении ППЭ у пациенток в постменопаузе должна учитывать в качестве мишени не только ткань эндометрия, но и МНФК. Назначать гормональные препараты необходимо с осторожностью, учитывая их возможное отрицательное действие на иммунокомпетентные клетки.

Для определения синтетического препарата, наиболее щадяще влияющего на иммунную систему, мы изучили относительную связывающую активность

рецепторов прогестерона в МНФК с гестагенами (P4 = 100%) и определили, что так называемые сильные гестагены (медроксипрогестерона ацетат и норэтистерон), которые используют для лечения ППЭ, в 2 раза слабее связываются с МНФК по сравнению с прогестероном ($p < 0,05$). Тем не менее данные препараты будут оказывать гестагенное действие на иммунокомпетентные клетки, т. е. снижать антипролиферативную активность. Поэтому в качестве перспективного лекарственного препарата для контроля этих процессов в нашем экспериментальном исследовании был выбран препарат с антигестагенным действием (мифепристон).

Мифепристон активно и хорошо связывается с рецепторами прогестерона в мононуклеарах, и его широко изучают в клинических исследованиях для лечения гормонзависимых процессов [28]. Нами был использован мифепристон, а не более современные препараты, потому что он обладает противоопухолевой активностью и не гепатотоксичен [29], что очень важно для пациенток периода постменопаузы.

В эксперименте при изучении действия прогестерона на МНФК мы выявили, что он повышает уровень экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона у здоровых женщин и пациенток с полипами эндометрия (рис. 5, 6), а значит и чувствительность к отрицательному действию половых стероидных гормонов на функцию МНФК. В других работах изучали дифференциальное влияние различных концентраций прогестерона на синтез цитокинов [30]. Полученные нами данные (мы применяли прогестерон в наномолярных концентрациях) не противоречат этим данным.

При изучении влияния мифепристона мы выявили его положительное действие на МНФК пациенток с полипами эндометрия в виде снижения экспрессии генов рецепторов ER α , ER β , mPR, PGRmC1, PRA, PRB в МНФК (рис. 5, 6), что, на наш взгляд, нивелирует негативное действие половых стероидных гормонов на иммунокомпетентные клетки. Это свидетельствует о целесообразности назначения данного препарата пациенткам с патологией эндометрия с целью снижения чувствительности МНФК к подавляющему действию половых гормонов и нормализации иммунного фона. Полученные данные требуют проведения дальнейших исследований.

Выявленное нами подавляющее действие мифепристона на жизнеспособность мононуклеаров требует проведения дальнейших исследований с целью поиска препаратов, наиболее щадяще влияющих на иммунокомпетентные клетки, но в то же время снижающих повышенную экспрессию рецепторов эстрадиола и прогестерона в МНФК.

ВЫВОДЫ

Для выбора варианта патогенетически обоснованной гормональной терапии пациенток с ППЭ в постменопаузе необходимо выяснение рецепторного статуса не только ткани эндометрия, но и мононуклеаров периферической крови пациенток с целью прогнозирования ответа ткани эндометрия и влияния на иммунокомпетентные клетки гормональной терапии. Высокий уровень мРНК PRA в ткани гиперплазии эндометрия является предиктором эффективности противорецидивной гормональной терапии гестагенными препаратами. При высоких показателях PRB гестагенотерапия может быть опасной — способной привести к непредсказуемому ответу ткани и прогрессированию пролиферации.

Текущая неэффективность стандартной гестагенной гормональной терапии ППЭ, по-видимому, объясняется недооценкой ее ингибирующего влияния на иммунную систему. Перспективно дальнейшее изучение влияния

гормональных препаратов на функцию МНФК и поиск препаратов, нивелирующих негативное действие половых стероидных гормонов на функцию иммунокомпетентных клеток, но не снижающих их жизнеспособность.

Литература

- Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О., редакторы. Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2021; 239 с.
- Курцер М. А., Бреусенко В. Г., Голухов Г. Н., Голова Ю. А., Есипова И. А., Овчинникова А. В., Ляфшишева Д. М. Диагностика и лечение доброкачественных внутриматочных заболеваний у пациенток в постменопаузе. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2019; 18 (3): 71–79.
- Vetter MH, Smith B, Benedict J, Hade EM, Bixel K, Copeland LJ, et al. Preoperative predictors of endometrial cancer at time of hysterectomy for endometrial intraepithelial neoplasia or complex atypical hyperplasia. *Am J Obstet Gynecol*. 2020; 222 (1).
- Думановская М. Р., Чернуха Г. Е., Табеева Г. И., Асатурова А. В. Гиперплазия эндометрия: поиск оптимальных решений и стратегий. Акушерство и гинекология. 2021; 4: 23–31.
- Mittermeier T. Levonorgestrel-releasing intrauterine system for endometrial hyperplasia. Mittermeier T, Farrant C, Wise MR. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020; 9 (9): CD012658. DOI:10.1002/14651858.CD012658.pub2.
- Dolapcioglu K, Boz A, Baloglu A. The efficacy of intrauterine versus oral progestin for the treatment of endometrial hyperplasia. A prospective randomized comparative study. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2013; 40: 122–6.
- Ашрафян Л. А., Антонова И. Б., Ивашина С. В., Бабаева Н. А., Алешикова А. И., Баранов И. И. Оптимизация диагностической тактики у пациенток с аномальными маточными кровотечениями в периоды пери- и постменопаузы. Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения, 2019; 1 (23). Доступно по ссылке (дата обращения: 07.06.2021): <https://cyberleninka.ru/article/n/optimizatsiya-diagnosticheskoy-taktiki-u-patsientok-s-anomalnymi-matochnymi-krovotecheniya-v-periody-peri-i-postmenopauzy>.
- Russo M, Newell JM, Budurlean L, Houser KR, Sheldon K, Kesterson J, et al. Mutational profile of endometrial hyperplasia and risk of progression to endometrioid adenocarcinoma. *Cancer*. 2020; 126 (12): 2775–83. DOI: 10.1002/cncr.32822.
- Унаниян А. Л., Сидорова И. С., Коган Е. А., Бабуринов Д. В. Клинико-патогенетические особенности гиперпластических процессов эндометрия у женщин перименопаузального возраста. *PMЖ «Медицинское обозрение»*. 2018; 1 (1): 67–71.
- Patel MV, Shen Z, Rodriguez-Garcia M, Usherwood EJ, Tafe LJ, Wira CR. Endometrial Cancer Suppresses CD8+ T Cell-Mediated Cytotoxicity in Postmenopausal Women. *Front Immunol*. 2021. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.657326>.
- Wang C, Tran DA, Fu MZ, Chen W, Fu SW, Li X. Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER2 Receptor Markers in Endometrial Cancer. *J Cancer*. 2020; 11 (7): 1693–701. DOI: 10.7150/jca.41943.
- Кадагидзе З. Г. Субпопуляции лимфоцитов при злокачественном росте. *Вопр. онкологии*. 1984; 1: 90–97.
- Dama A, Baggio C, Boscaro C, Albiero M, Cignarella A. Estrogen Receptor Functions and Pathways at the Vascular Immune Interface. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (8): 4254. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22084254>.
- Bouman A, Schipper M, Heineman MJ, Faas M. 17beta-estradiol and progesterone do not influence the production of cytokines from lipopolysaccharide-stimulated monocytes in humans. *Fertil Steril*. 2004; 82 (Suppl 3): 1212–9.
- Фисенко В. П., редактор. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Ремедиум, 2000; 398 с.
- Савельева Г. М., Бреусенко В. Г., Карева Е. Н., и др. Изучение роли экспрессии генов рецепторов эстрогенов и прогестерона в возникновении пролиферативных процессов в эндометрии для решения вопроса о тактике ведения больных с указанными патологическими изменениями эндометрия. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2018; 18 (6): 17–24. DOI: 10.17116/rosakush20181806117.
- Савельева Г. М., Бреусенко В. Г., Карева Е. Н., Ивановская Т. Н., Тихонов Д. А., Гуторова Д. С. Стероидно-рецепторный профиль мононуклеаров периферической крови у пациенток в постменопаузе с пролиферативными процессами эндометрия. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2019; 18 (3): 80–86.
- Obata T, Nakamura M, Mizumoto Y, Iizuka T, Ono M, Terakawa J, et al. Dual expression of immunoreactive estrogen receptor — and p53 is a potential predictor of regional lymph node metastasis and postoperative recurrence in endometrial endometrioid carcinoma. *PLoS ONE*; 12 (11): 2017: e0188641. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188641>.
- Singh P, Chaurasia A, Dhingra V, Misra V. Expression of ERα and PR in Various Morphological Patterns of Abnormal Uterine Bleeding-Endometrial causes in Reproductive Age Group. *J Clin Diagn Res*. 2016;10 (8): EC06-EC9. DOI: 10.7860/JCDR/2016/19565.829.
- Swasti. Estrogen and progesterone receptors in endometrial cancer: where are we today? *Gynecol Obstet*. 2018; 8: 2. DOI: 10.4172/2161-0932.1000e127.
- Greca A, Bellora N, Dily F, Jara R, Nacht AS, Oliéte JQ, et al. Chromatin topology defines estradiol-primed progesterone receptor and PAX2 binding in endometrial cancer cells. 2022; *eLife*. 11: e66034. Available from: <https://doi.org/10.7554/eLife.66034>.
- Sinreih M, Knific T, Thomas P, Frković Grazio S, Rižner TL. Membrane progesterone receptors — and — have potential as prognostic biomarkers of endometrial cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018; 178: 303–11. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2018.01.011. PMID: 29353001.
- Trenti A, Tedesco S, Boscaro C, Trevisi L, Bolego C, Cignarella A. Estrogen, Angiogenesis, Immunity and Cell Metabolism: Solving the Puzzle. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (3): 859. DOI: 10.3390/ijms19030859. PMID: 29543707. PMCID: PMC5877720.
- Navarro FC, Herrmeiter C, Nowak L, Watkins SK. Estrogen Regulation of T-Cell Function and Its Impact on the Tumor Microenvironment. *Gender and the Genome*. 2018; 2 (3): 81–91. DOI: 10.1177/2470289718801379 journals.sagepub.com/home/gng.
- Arruvalo L, et al. NK Cells Expressing a Progesterone Receptor Are Susceptible to Progesterone-Induced Apoptosis. *J Immunol*. 2008; 180 (8): 5746–5753. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5746>.
- Polikarpova AV, Levina IS, Sigai NV, Zavarzin IV, Morozov IA, Rubtsov PM, Guseva AA, Smirnova OV, Shchelkunova TA. Immunomodulatory effects of progesterone and selective ligands of membrane progesterone receptors. *Steroids*. 2019; 145: 5–18. DOI: 10.1016/j.steroids.2019.02.009. Epub 2019 Feb 10. PMID: 30753845.
- Hasni MS, Yakimchuk K. Expression and effects of ligand-activated estrogen receptors in chronic lymphocytic leukemia. *Anticancer research*. 2019; 39: 167–172. DOI: 10.21873/anticancer.13093.
- Shen Q, Zou S, Sheng B, Zhao M, Sun LZ, Zhu X. Mifepristone inhibits IGF-1 signaling pathway in the treatment of uterine leiomyomas. *Drug Des Devel Ther*. 2019; 13: 3161–70. DOI: 10.2147/DDDT.S212157. PMID: 31564832. PMCID: PMC6731989.
- Lukovic J, Milosavljević Z, Zečević Luković T, Mitrović M,


- Andjelković M, et al. Antitumor effect of mifepristone on human endometrial stromal cell line. *Vojnosanitetski Pregled*. 2021; 78 (6).
30. Kırıcı P, Tanrıverdi E. Effects of different progesterone doses on

the concentrations of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pregnant women with threatened abortion. 2021; 13 (11): e19333. DOI: 10.7759/cureus.19333.

References

- Kaprin AD, Starinskij VV, Shaxzadova AO, redaktory. Sostoyanie onkologicheskoi pomoshhi naseleniyu Rossii v 2020 godu. M.: MNI OI im. P.A. Gercena, 2021; 239 s. Russian.
- Kurcer MA, Breusenko VG, Goluxov GN, Golova YuA, Esipova IA, Ovchinnikova AV, et al. Diagnostika i lechenie dobrokachestvennykh vnutrimatochnykh zabolevanii u pacientok v postmenopauze. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii*. 2019; 18 (3): 71–79. Russian.
- Vetter MH, Smith B, Benedict J, Hade EM, Bixel K, Copeland LJ, et al. Preoperative predictors of endometrial cancer at time of hysterectomy for endometrial intraepithelial neoplasia or complex atypical hyperplasia. *Am J Obstet Gynecol*. 2020; 222 (1).
- Dumanovskaya MR, Chernuxa GE, Tabeeva GI, Asaturova AV. Giperplaziya ehndometriya: poisk optimal'nykh reshenii i strategii. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2021; 4: 23–31. Russian.
- Mittermeier T. Levonorgestrel-releasing intrauterine system for endometrial hyperplasia. Mittermeier T, Farrant C, Wise MR. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020; 9 (9): CD012658. DOI:10.1002/14651858.CD012658.pub2.
- Dolapcioglu K, Boz A, Baloglu A. The efficacy of intrauterine versus oral progestin for the treatment of endometrial hyperplasia. A prospective randomized comparative study. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2013; 40: 122–6.
- Ashrafyan LA, Antonova IB, Ivashina SV, Babaeva NA, Aleshikova AI, Baranov II. Optimizatsiya diagnosticheskoi taktiki u pacientok s anomal'nymi matochnymi krovotocheniami v periody peri- i postmenopauzy. *Akusherstvo i ginekologiya*: Novosti. Mneniya. Obucheniya, 2019; 1 (23). Dostupno po ssylke (data obrashcheniya: 07.06.2021): <https://cyberleninka.ru/article/n/optimizatsiya-diagnosticheskoy-taktiki-u-patsientok-s-anomalnymi-matochnymi-krovotocheniyami-v-periody-peri-i-postmenopauzy>. Russian.
- Russo M, Newell JM, Budurlean L, Houser KR, Sheldon K, Kesterson J, et al. Mutational profile of endometrial hyperplasia and risk of progression to endometrioid adenocarcinoma. *Cancer*. 2020; 126 (12): 2775–83. DOI: 10.1002/cncr.32822.
- Unanyan AL, Sidorova IS, Kogan EA, Baburin DV. Kliniko-patogeneticheskie osobennosti giperplasticheskikh processov ehndometriya u zhenshin perimenopauzal'nogo vozrasta. *RMZh «Meditsinskoe obozrenie»*. 2018; 1 (1): 67–71. Russian.
- Patel MV, Shen Z, Rodriguez-Garcia M, Usherwood EJ, Tafe LJ, Wira CR. Endometrial Cancer Suppresses CD8+ T Cell-Mediated Cytotoxicity in Postmenopausal Women. *Front Immunol*. 2021. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.657326>.
- Wang C, Tran DA, Fu MZ, Chen W, Fu SW, Li X. Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER2 Receptor Markers in Endometrial Cancer. *J Cancer*. 2020; 11 (7): 1693–701. DOI: 10.7150/jca.41943.
- Kadagidze Z. G. Subpopulyatsii limfocitov pri zlokachestvennom roste. *Vopr. onkologii*. 1984; 1: 90–97.
- Dama A, Baggio C, Boscaro C, Albiero M, Cignarella A. Estrogen Receptor Functions and Pathways at the Vascular Immune Interface. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (8): 4254. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22084254>.
- Bouman A, Schipper M, Heineman MJ, Faas M. 17beta-estradiol and progesterone do not influence the production of cytokines from lipopolysaccharide-stimulated monocytes in humans. *Fertil Steril*. 2004; 82 (Suppl 3): 1212–9.
- Fisenko VP, redaktor. *Rukovodstvo po ehksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv*. M.: Remedium, 2000; 398 s. Russian.
- Saveleva GM, Breusenko VG, Kareva EN, i dr. Izuchenie roli ehkspressii genov receptorov ehstrogenov i progesterona v vozniknovenii proliferativnykh processov v ehndometrii dlya resheniya voprosa o taktike vedeniya bol'nykh s ukazannyimi patologicheskimi izmeneniyami ehndometriya. *Rossiiskij vestnik akushera-ginekologa*. 2018; 18 (6): 17–24. DOI: 10.17116/rosakush20181806117. Russian.
- Saveleva GM, Breusenko VG, Kareva EN, Ivanovskaya TN, Tikhonov DA, Gutorova DS. Steroid-receptor profile of the peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal patients with endometrial proliferative processes. *Vopr. ginekol. akus. perinatol. (Gynecology, Obstetrics and Perinatology)*. 2019; 18 (3): 80–86. DOI: 10.20953/1726-1678-2019-3-80-86. Russian.
- Obata T, Nakamura M, Mizumoto Y, Iizuka T, Ono M, Terakawa J, et al. Dual expression of immunoreactive estrogen receptor — and p53 is a potential predictor of regional lymph node metastasis and postoperative recurrence in endometrial endometrioid carcinoma. *PLoS ONE*; 12 (11): 2017: e0188641. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188641>.
- Singh P, Chaurasia A, Dhirg V, Misra V. Expression of ERα and PR in Various Morphological Patterns of Abnormal Uterine Bleeding-Endometrial causes in Reproductive Age Group. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10 (8): EC06-EC9. DOI: 10.7860/JCDR/2016/19565.829.
- Swasti. Estrogen and progesterone receptors in endometrial cancer: where are we today? *Gynecol Obstet*. 2018; 8: 2. DOI: 10.4172/2161-0932.1000e127.
- Greca A, Bellora N, Dily F, Jara R, Nacht AS, Olette JQ, et al. Chromatin topology defines estradiol-primed progesterone receptor and PAX2 binding in endometrial cancer cells. 2022; eLife. 11: e66034. Available from: <https://doi.org/10.7554/eLife.66034>.
- Sinreich M, Knific T, Thomas P, Frković Grazio S, Rižner TL. Membrane progesterone receptors — and — have potential as prognostic biomarkers of endometrial cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018; 178: 303–11. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2018.01.011. PMID: 29353001.
- Trenti A, Tedesco S, Boscaro C, Trevisi L, Bolego C, Cignarella A. Estrogen, Angiogenesis, Immunity and Cell Metabolism: Solving the Puzzle. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (3): 859. DOI: 10.3390/ijms19030859. PMID: 29543707. PMCID: PMC5877720.
- Navarro FC, Herrnreiter C, Nowak L, Watkins SK. Estrogen Regulation of T-Cell Function and Its Impact on the Tumor Microenvironment. *Gender and the Genome*. 2018; 2 (3): 81–91. DOI: 10.1177/2470289718801379 journals.sagepub.com/home/gng.
- Arruvito L, et al. NK Cells Expressing a Progesterone Receptor Are Susceptible to Progesterone-Induced Apoptosis. *J Immunol*. 2008; 180 (8): 5746–5753. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5746>.
- Polikarpova AV, Levina IS, Sigai NV, Zavarzin IV, Morozov IA, Rubtsov PM, Guseva AA, Smirnova OV, Shchelkunova TA. Immunomodulatory effects of progesterone and selective ligands of membrane progesterone receptors. *Steroids*. 2019; 145: 5–18. DOI: 10.1016/j.steroids.2019.02.009. Epub 2019 Feb 10. PMID: 30753845.
- Hasni MS, Yakimchuk K. Expression and effects of ligand-activated estrogen receptors in chronic lymphocytic leukemia. *Anticancer research*. 2019; 39: 167–172. DOI: 10.21873/anticancer.13093.
- Shen Q, Zou S, Sheng B, Zhao M, Sun LZ, Zhu X. Mifepristone inhibits IGF-1 signaling pathway in the treatment of uterine leiomyomas. *Drug Des Devel Ther*. 2019; 13: 3161–70. DOI: 10.2147/DDDT.S212157. PMID: 31564832. PMCID: PMC6731989.
- Lukovic J, Milosavljević Z, Zečević Luković T, Mitrović M, Andjelković M, et al. Antitumor effect of mifepristone on human endometrial stromal cell line. *Vojnosanitetski Pregled*. 2021; 78 (6).
- Kırıcı P, Tanrıverdi E. Effects of different progesterone doses on the concentrations of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pregnant women with threatened abortion. 2021; 13 (11): e19333. DOI: 10.7759/cureus.19333.

ИЗМЕНЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО ПРОФИЛЯ В СИСТЕМЕ «МАТЬ–ПЛОД» ПРИ COVID-19

Н. А. Ломова , В. В. Чаговец, Е. Л. Долгополова, А. В. Новоселова, У. Л. Петрова, Р. Г. Шмаков, В. Е. Франкевич

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия


Вирус SARS-CoV-2 оказывает значительное влияние на организм человека, и актуален вопрос о характере этого воздействия на молекулярном уровне. COVID-19 не только оказывает влияние на мать в период беременности, но и повышает риск осложнений в раннем неонатальном периоде и может иметь отдаленные последствия для здоровья новорожденного. Целью исследования было определить влияние COVID-19 на аминокислотный состав венозной крови беременных, амниотической жидкости и плазмы пуповинной крови для разработки диагностической панели, а также провести анализ возможных последствий для состояния новорожденного. Основную группу составили 29 пациенток с подтвержденным диагнозом COVID-19; контрольную группу — 17 соматически здоровых женщин. На первом этапе работы был проведен анализ аминокислотного профиля. Обнаруженные различия в содержании аминокислот в различных биологических жидкостях позволили разработать модели логистической регрессии. По данным математического анализа задействованности метаболических путей маркеров-аминокислот в венозной и пуповинной плазме крови матерей и новорожденных в группе с COVID-19 обнаружено статистически значимое изменение биосинтеза и путей метаболизма ряда аминокислот, задействованных в реализации воспалительной реакции, изменений энергетического метаболизма, нарушений регуляции экспрессии и транскрипции белковых молекул и пр. Эти результаты могут быть использованы для выбора направления дальнейших исследований возможных последствий для здоровья новорожденных от матерей, перенесших COVID-19, и определения требований к лечению и медицинской помощи беременным женщинам и новорожденным после постановки диагноза COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, аминокислоты, масс-спектрометрия, плазма, пуповинная кровь, венозная кровь, амниотическая жидкость, маркеры состояния новорожденного, метаболические пути

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант рег. № 2004-60093.

Вклад авторов: Н. А. Ломова — анализ клинических данных, систематический анализ, написание рукописи; В. В. Чаговец — проведение метаболомного анализа методом масс-спектрометрии, статистический анализ полученных данных, редактирование рукописи; Е. Л. Долгополова — сбор и подготовка биологических сред в условиях «красной зоны», статистический анализ результатов; А. В. Новоселова — проведение метаболомного анализа методом масс-спектрометрии, обработка масс-спектрометрических данных; У. Л. Петрова — сбор и подготовка биологических сред в условиях «красной зоны»; Р. Г. Шмаков — анализ клинических данных в условиях «красной зоны», систематический анализ, редактирование рукописи; В. Е. Франкевич — подготовка исследования, систематический анализ, написание и редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова (протокол № 13 от 10 декабря 2020 г.), проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации, Международной конференции по гармонизации (ICH), Стандартов надлежащей клинической практики (GCP), ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» № 323-ФЗ от 21 ноября 2011 г. Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

 **Для корреспонденции:** Наталья Анатольевна Ломова
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; natasha-lomova@yandex.ru

Статья получена: 14.04.2022 **Статья принята к печати:** 28.04.2022 **Опубликована онлайн:** 17.05.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.025

ALTERED AMINO ACID PROFILES OF THE “MOTHER–FETUS” SYSTEM IN COVID-19

Lomova NA , Chagovets VV, Dolgoplova EL, Novoselova AV, Petrova UL, Shmakov RG, Frankevich VE

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia


Systemic nature of the human body response to SARS-CoV-2 requires dedicated analysis at the molecular level. COVID-19 during pregnancy affects maternal health and may entail complications in the early neonatal period and possibly long-term consequences for the offspring. The aim of the study was to assess the impact of COVID-19 on amino acid profiles in maternal venous blood, amniotic fluid and umbilical cord blood in order to develop a diagnostic panel accounting for possible consequences. The main group included 29 pregnant patients with a confirmed diagnosis of COVID-19 and the control group included 17 somatically healthy pregnant women. Amino acid profiles of the biological fluids were measured by high-performance liquid chromatography combined to mass spectrometry (HPLC-MS) and assessed in logistic regression models. The analysis revealed altered content of certain amino acids, their biosynthetic precursors and metabolites in the biological fluids collected from patients with COVID-19 possibly reflecting the development of systemic inflammatory reaction and associated changes in gene expression profiles. These findings may guide further research into health outcomes for neonates born from mothers infected with SARS-CoV-2 during pregnancy. The study may help to develop advanced recommendations and differential care protocols for pregnant women and newborns diagnosed with COVID-19.

Keywords: COVID-19, amino acids, mass spectrometry, blood plasma, umbilical cord blood, venous blood, amniotic fluid, clinical neonatal markers, metabolic pathways

Funding: the study was funded by the Russian Foundation for Basic Research, grant reg. number 2004-60093.

Author contribution: Lomova NA — clinical data management, manuscript writing; Chagovets VV — mass spectrometry assay, statistical analysis of the data, manuscript editing; Dolgoplova EL — collection and processing of clinical samples in “red zone”, statistical analysis of the data; Novoselova AV — mass spectrometry assay, processing of spectral data; Petrova UL — collection and processing of clinical samples in “red zone”; Shmakov RG — clinical sample collection and data management, manuscript editing; Frankevich VE — concept, data management, writing and editing of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review Board at the V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol № 13 of 10 December 2020) and carried out in compliance with Declaration of Helsinki, the International Conference on Harmonization (ICH) Good Clinical Practice (GCP) Guideline, and Federal Law № 323-FZ “On Basics of Health Protection of Citizens in the Russian Federation” of 21 November 2011. Informed consent for the study was provided by all participants.

 **Correspondence should be addressed:** Natalia A. Lomova
Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; natasha-lomova@yandex.ru

Received: 14.04.2022 **Accepted:** 28.04.2022 **Published online:** 17.05.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.025

За последние 50 лет свыше 300 раз возникали вспышки новых или давно забытых инфекций, в том числе три коронавирусные инфекции в 2002, 2012 и 2019 г. Их появление обусловлено непосредственным контактом старого и нового биологических хозяев вируса и отсутствием соблюдения санитарно-гигиенических требований, что характерно для азиатских рынков. Коронавирусы составляют обширное семейство из 40 вирусов, семь из которых вызывают заболевания у человека. Некоторые коронавирусы, обычно заражающие животных, постепенно эволюционировали и оказались способными заражать людей. COVID-19, вероятно, является одним из таких вирусов, инфицирование которым предположительно впервые произошло на крупном оптовом рынке животных и морепродуктов в Ухане. Вспышка тяжелого острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом (SARS-CoV-2), началась в 2019 г. в Китае и быстро привела к всемирной пандемии, поставившей системы здравоохранения перед необходимостью оказания интенсивной терапии огромному количеству пациентов.

По данным исследований, в случае заражения беременные подвержены более высокому риску развития тяжелых форм COVID-19 по сравнению с другими женщинами аналогичного возраста [1]. Кроме того, заболевание COVID-19 во время беременности ассоциируется с повышенным риском преждевременных родов [1, 2]. Особенно высокому риску развития серьезных осложнений в случае заражения COVID-19 подвержены беременные женщины старшего возраста, страдающие избыточным весом или сопутствующими патологическими состояниями и заболеваниями, такими как гипертензия или диабет [3].

Встречаются сообщения о единичных случаях вертикальной передачи вируса, а также о тяжелых заболеваниях в антенатальном периоде у беременных; все они требуют дальнейшего изучения [4–7]. На сегодняшний день, по данным ВОЗ, случаев обнаружения COVID-19 в пробах околоплодной жидкости или грудного молока не отмечено. Способность активного вируса передаваться от матери плоду или новорожденному во время беременности и родов пока не установлена. Очевиден факт того, что новорожденные дети от матерей, инфицированных COVID-19, могут иметь высокий риск осложнений в раннем неонатальном периоде и отдаленные последствия для здоровья.

На сегодняшний день наиболее перспективным направлением диагностики и отдаленного прогноза заболевания выступают омиксные исследования и, в частности, изучение метаболома. Они позволяют выделить маркеры, имеющие потенциально важное значение для подтверждения инфекции, определения тяжести заболевания и возможного исхода при SARS-CoV-2. В 2020 г. удалось установить корреляцию 204 метаболитов в плазме крови пациентов с COVID-19 с тяжестью заболевания [8]. Аминокислоты являются составной частью метаболома и участвуют во всех процессах жизнедеятельности человека. При нарушении содержания тех или иных аминокислот организм не может эффективно функционировать и развиваться. Именно поэтому существуют оптимальные уровни аминокислот в организме, которые обеспечивают сбалансированные обменные процессы. Так, было показано, что концентрации аминокислот изменяются при серечно-сосудистой патологии [9], пневмонии, вызванной вирусом гриппа H1N1 [10], хронической обструктивной болезни легких [11]. Ряд

патологий в неонатологии, таких как болезни накопления и другие, выявляют путем анализа аминокислот в сухой капле крови [12]. Связанные с заболеваниями изменения метаболических профилей физиологических жидкостей человеческого организма исследуют для выяснения патофизиологии целого ряда заболеваний. Например, метаболомный анализ показал, что изменение метаболизма аминокислот коррелирует с изменением гомеостаза кислорода у пациентов с COVID-19 [13]. Еще в одном исследовании аминокислотных профилей у взрослых и детей с COVID-19 выявлены изменения, которые могут быть связаны с эндотелиальной дисфункцией и нарушением регуляции Т-лимфоцитов [14, 15].

В нашем опубликованном ранее исследовании был проведен поиск прогностических маркеров COVID-19 в амниотической жидкости и пуповинной крови [16]. Целью настоящего исследования было проанализировать аминокислотный состав венозной, пуповинной крови и амниотической жидкости, отображающих систему мать–плод, и описать метаболические пути, их возможное клиническое значение и последующие потенциальные отдаленные результаты.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова (ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова») на базе первого инфекционного отделения в период с марта по май 2020 г. была создана «красная зона», где проходили лечение и обследование пациенты с диагнозом COVID-19, в том числе беременные женщины.

В данное исследование были включены 46 беременных, которые поступили и были родоразрешены в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова». Основную группу составили 29 пациенток с подтвержденным диагнозом COVID-19; контрольную — 17 соматически здоровых женщин с беременностью без осложнений. Диагноз COVID-19 был подтвержден с помощью ПЦР-теста («ДНК-Технология»; Россия). Включение в группу происходило по мере обращения. Критерии включения в I группу: наличие COVID-19, установленной по данным молекулярно-генетического обследования (ПЦР). Критерии включения во II группу: отсутствие COVID-19 по данным клинического обследования, результатам ПЦР-исследования. Критерии исключения: многоплодная беременность, резус- и АВ0-изоиммунизации, хромосомные аномалии, генетические мутации и врожденные пороки развития у плода.

Для анализа были собраны венозная плазма беременных, пуповинная плазма их новорожденных детей и амниотическая жидкость. Транспортировку и последующий анализ осуществляли на территории ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» в помещениях, сертифицированных для работы с образцами II степени опасности. В работе использовали стандартный набор и модифицированный протокол компании-производителя (JASEM; Турция) для приготовления и последующего анализа 31 аминокислоты в физиологических жидкостях. Анализ образцов осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе 1260 Infinity II (Agilent; США) с детектированием на масс-спектрометре (MC) 6460 Triple Quad (Agilent; США). Транзитные переходы между родительскими ионами и дочерними фрагментами для анализируемых аминокислот, соответствующее им хроматографическое время удерживания, концентрации

Таблица 1. Клиническая характеристика беременных женщин, заболевших COVID-19

Клиническая характеристика	COVID-19, <i>n</i> = 29 (%)
Наличие симптомов	21 (71,41)
Повышенная температура (> 37 °C)	12 (41,38)
Потеря обоняния	7 (24,14)
Боль в горле	3 (10,34)
Одышка	4 (13,79)
Кашель	12 (41,38)
Утомляемость	4 (13,79)
Легкая степень тяжести	22 (75,86)
Средняя степень тяжести	6 (20,69)
Тяжелая степень тяжести	1 (3,45)

внутренних стандартов, а также сведения о чувствительности и воспроизводимости анализа приведены в руководстве JASEM.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью скриптов, написанных на языке R (R Core Team; Австрия) в RStudio (R. RStudio, Inc.; США). Нормальность распределения количественных данных оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для описания данных, имеющих нормальное распределение, использовали среднее арифметическое и стандартное отклонение. При распределении, отличающемся от нормального, данные представляли медианой (Me) и квантилями Q1 и Q3 в формате Me (Q1; Q3). Статистический анализ проводился с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента для нормально распределенных данных и непараметрического критерия Манна–Уитни, если распределение было отличным от нормального. Величину порогового уровня значимости *p*-value принимали равной 0,05. Если значение *p* было меньше 0,001, то *p*-value указывали в формате *p*-value < 0,001. Для оценки возможности классификации пациентов по группам на основании аминокислотного профиля были разработаны модели логистической регрессии. В качестве независимых переменных в моделях рассматривали все возможные комбинации аминокислот. В качестве зависимой переменной выступала принадлежность пациентки к одной из исследуемых групп. Из всех разработанных моделей выбирали четыре с наибольшей величиной площади под ROC-кривой (AUC). Для каждой модели были определены критерий Уальда, 95% доверительный интервал (ДИ), отношение шансов (ОШ) и его доверительный интервал. Качество разработанных моделей оценивали с помощью

ROC-анализа, а также расчета чувствительности и специфичности. В работе использовали возможности пачетa MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) с подключенной библиотекой путей и соединений KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Статистическую значимость метаболического пути определяли исходя из гипергеометрического теста с коррекцией по Бенджамини–Хохбергу. Влияние метаболического пути определяли оценкой вклада маркера в путь, исходя из топологического анализа и меры относительного посредничества. К путям, связанным с развитием заболевания статистически значимо, относили пути с вероятностью ложного открытия (false discovery rate, FDR) меньше 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 46 женщин, из которых 29 пациенток находились в стационаре с подтвержденным диагнозом COVID-19, и 17 условно здоровых женщин, не болевших данной вирусной инфекцией (группа контроля). Клинические характеристики беременных женщин, заболевших COVID-19, представлены в табл. 1, а беременных женщин, включенных в исследование, — в табл. 2.

Случаев COVID-19 у новорожденных зарегистрировано не было. Все новорожденные были протестированы на SARS-CoV-2 сразу после рождения, а также на третий и 10-й дни после рождения. Полученные отрицательные результаты анализов всех новорожденных могут свидетельствовать об отсутствии вертикальной передачи инфекции. Случаев перинатальной смерти не зарегистрировано.

На лабораторном этапе работы был применен метод целевой метаболомики с использованием набора для количественного определения 31 аминокислоты методом

Таблица 2. Клиническая характеристика беременных женщин, включенных в исследование

Параметр	COVID-19, <i>n</i> = 29	Контроль, <i>n</i> = 17	<i>p</i> -value
Возраст	29,9 (± 5,03)	32,0 (± 5,03)	0,16
Рост	166,62 (± 7,37)	165,76 (± 7,34)	0,71
Вес	77,64 (± 11,58)	71,87 (± 9,75)	0,10
ИМТ	27,85 (± 4,52)	26,12 (± 3,16)	0,18
Срок родоразрешения	38 (± 1,52)	39,42 (± 1,14)	0,001
Масса новорожденного	3332 (± 484)	3585 (± 424)	0,08
Рост новорожденного	52,4 (± 2,66)	53,1 (± 2,29)	0,35
Апгар 1-я минута	8 (8; 8)	9 (9; 9)	0,69
Апгар 5-я минута	8 (8; 8)	9 (9; 9)	0,83

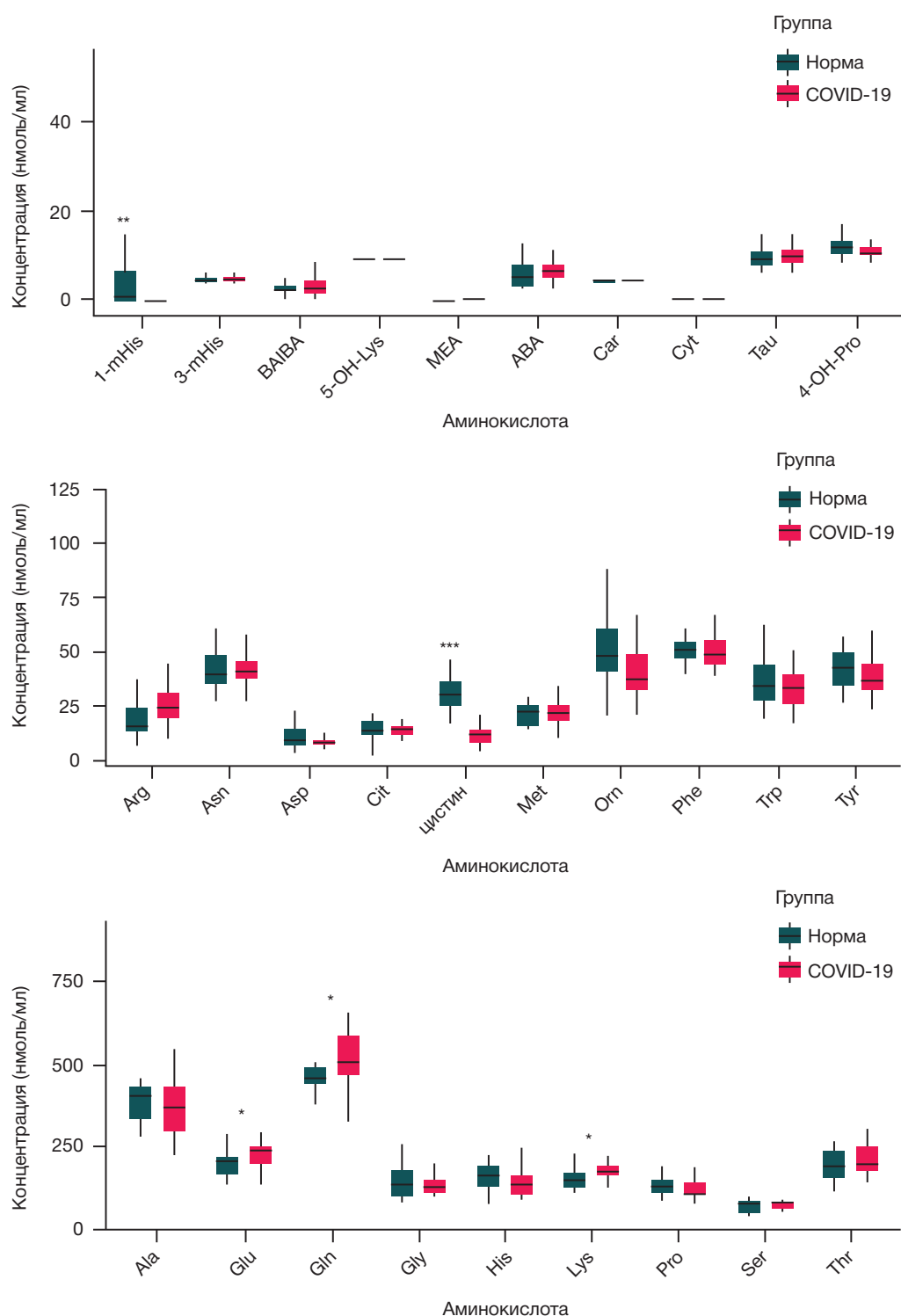


Рис. 1. Диаграмма размаха концентрации аминокислот в венозной плазме в группах контроля и COVID-19. Границами бокса служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния; * — p -value $\leq 0,05$; ** — p -value $\leq 0,01$; *** — p -value $\leq 0,001$. 1-mHis — 1-метил-L-гистидин; 3-mHis — 3-метил-L-гистидин; bAla — β -аланин; BAIBA — 3-аминоизомасляная кислота; 5-OH-Lys — DL-5-гидроксилизин; MEA — этаноламин; ABA — L-2-аминомасляная кислота; AAD — L-2-аминоадипиновая кислота; Ala — L-аланин; Arg — L-аргинин; Asn — L-аспарагин; Asp — L-аспарагиновая кислота; Car — L-карнозин; Cit — L-цитруллин; Cyt — L-цистатионин; цистин — L-цистин; Glu — L-глутаминовая кислота; Gln — L-глутамин; Gly — L-глицин; His — L-гистидин; Lys — L-лизин; Met — L-метионин; Orn — Лорнитин; Phe — L-фенилаланин; Pro — L-пролин; Ser — L-серин; Thr — L-треонин; Trp — L-триптофан; Tyr — L-тирозин; Val — L-валин; Tau — таурин; 4-OH-Pro — транс-4-гидрокси L-пролин

ВЭЖХ-МС в образцах венозной плазмы беременных, амниотической жидкости и плазмы пуповинной крови новорожденных детей, собранных в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова».

На первом этапе работы был проведен анализ аминокислотного профиля венозной плазмы беременных

в двух группах. Статистический анализ полученных экспериментальных данных позволил выявить пять аминокислот, концентрации которых статистически значимо отличались при COVID-19 (табл. П1, рис. 1): 1-метилгистидин, лизин, цистин, глутаминовая кислота и глутамин.

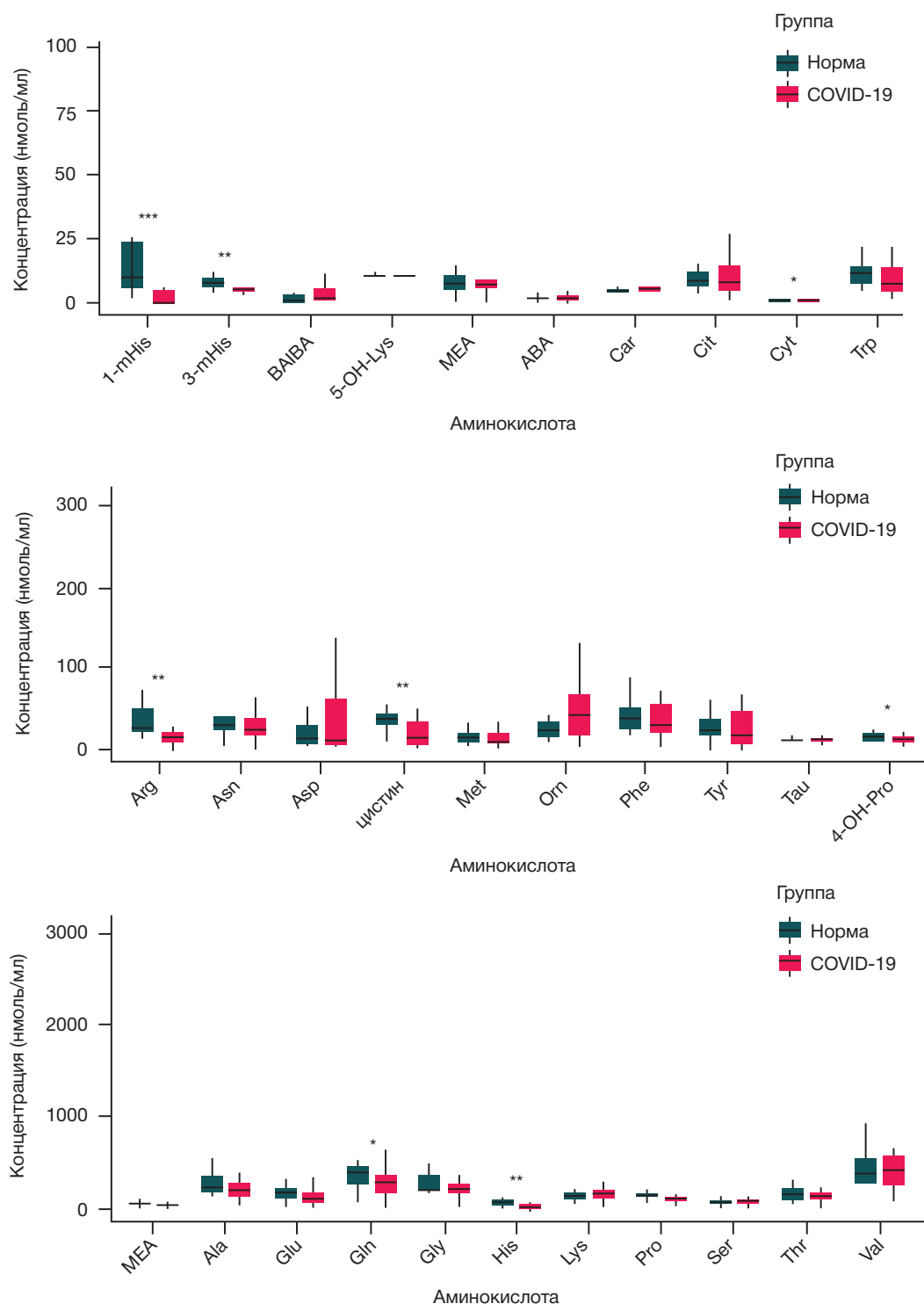


Рис. 2. Диаграмма размаха концентрации аминокислот в амниотической жидкости в группах контроля и COVID-19. Границами бокса служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния; * — $p\text{-value} \leq 0,05$; ** — $p\text{-value} \leq 0,01$; *** — $p\text{-value} \leq 0,001$. 1-mHis — 1-метилгистидин; 3-mHis — 3-метилгистидин; BAIBA — 3-аминоизомасляная кислота; 5-OH-Lys — 5-гидроксилизин; MEA — этаноламин; ABA — 2-аминомасляная кислота; AAD — 2-аминоадипиновая кислота; Car — карнозин; Cit — цитруллин; Cyt — цистатионин; 4-OH-Pro — *транс*-4-гидроксипролин

В связи с полученными результатами ВЭЖХ-МС-анализа было интересно разработать математическую модель, позволяющую различить образцы венозной плазмы пациентов группы COVID-19 и группы контроля. Для этого были построены модели логистической регрессии на базе концентраций аминокислот. Для построения моделей использовали все возможные комбинации аминокислот. Для каждой из моделей выполнили ROC-анализ и выбрали четыре модели,

характеризующиеся наибольшей площадью под ROC-кривой (AUC) (рис. П1, табл. П2).

Наибольшее значение AUC (0,78) было у модели, построенной на базе метилгистидина и цистина (табл. П3). Эта модель характеризуется чувствительностью 0,93 и специфичностью 0,94.

При анализе амниотической жидкости была определена концентрация 31 аминокислоты. Статистический анализ полученных экспериментальных данных позволил выявить

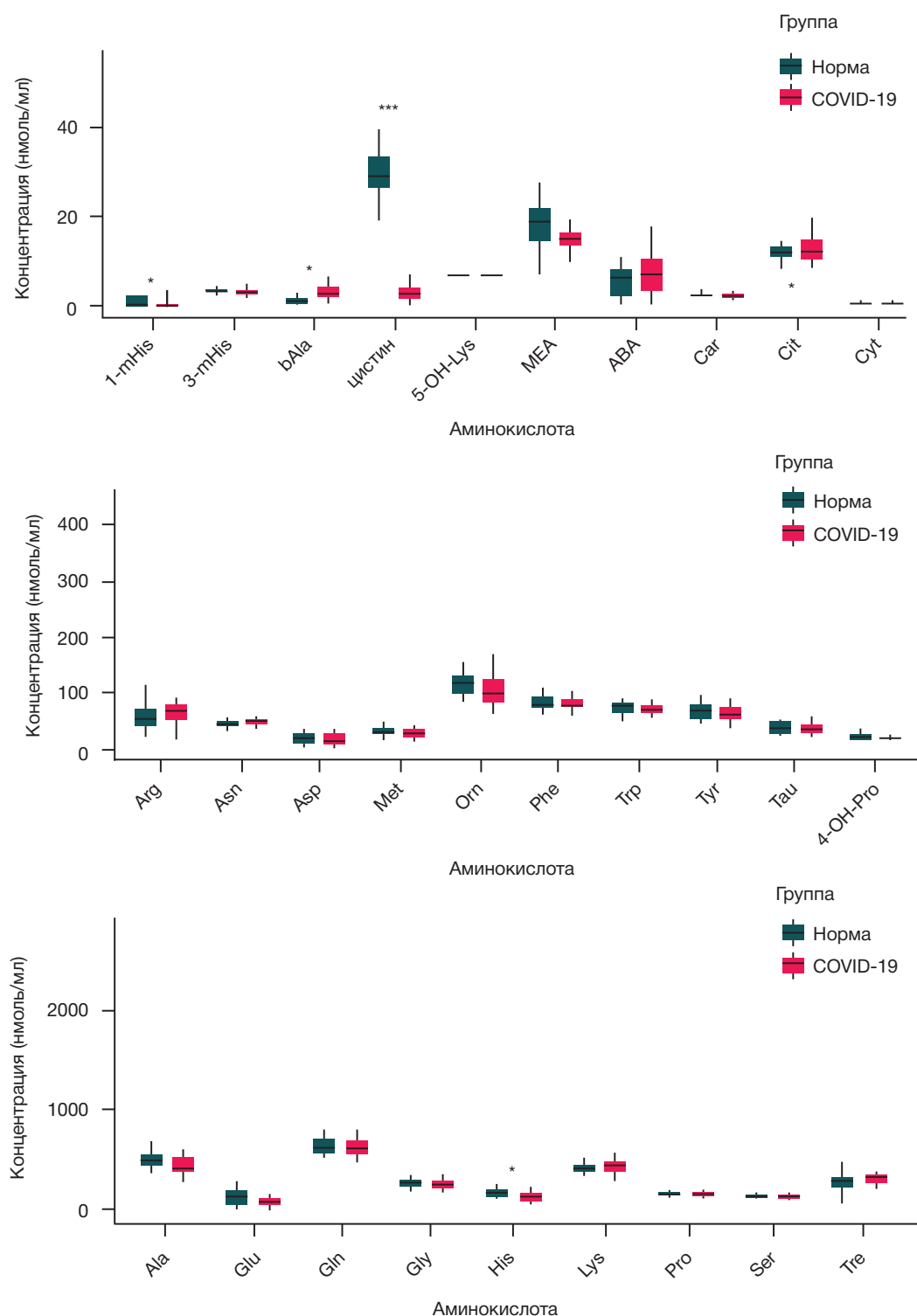


Рис. 3. Диаграмма размаха концентрации аминокислот в пуповинной плазме в группах контроля и COVID-19. Границами бокса служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния; * — p -value $\leq 0,05$; ** — p -value $\leq 0,01$; *** — p -value $\leq 0,001$. 1-mHis — 1-метилгистидин; 3-mHis — 3-метилгистидин; β -аланин — bAla; BAIBA — 3-аминоизомасляная кислота; 5-OH-Lys — 5-гидроксилизин; MEA — этаноламин; ABA — 2-аминомасляная кислота; AAD — 2-аминоадипиновая кислота; Car — карнозин; Cit — цитруллин; Cyt — цистатинин; 4-OH-Pro — транс-4-гидроксипролин

восемь аминокислот, концентрации которых статистически значимо различались при COVID-19 (рис. 2, табл. П4): 1-метилгистидин, 3-метилгистидин, аргинин, цистатинин, цистин, глутамин, гистидин, транс-4-гидроксипролин.

Результаты построения моделей логистической регрессии, позволяющих отличить амниотическую жидкость пациентов группы COVID-19 от таковой у группы контроля, представлены на рис. П2 и в табл. П5, П6.

Построение моделей для амниотической жидкости было аналогичным построению моделей для венозной плазмы. Наибольшее значение AUC (0,89) получено для модели, построенной на базе аргинина, цистина, гистидина и транс-4-гидроксипролина (табл. П6). Эта модель характеризуется чувствительностью 0,84 и специфичностью 0,93. Несколько более высокие значения чувствительности и специфичности (0,84 и 1 соответственно) были у модели,

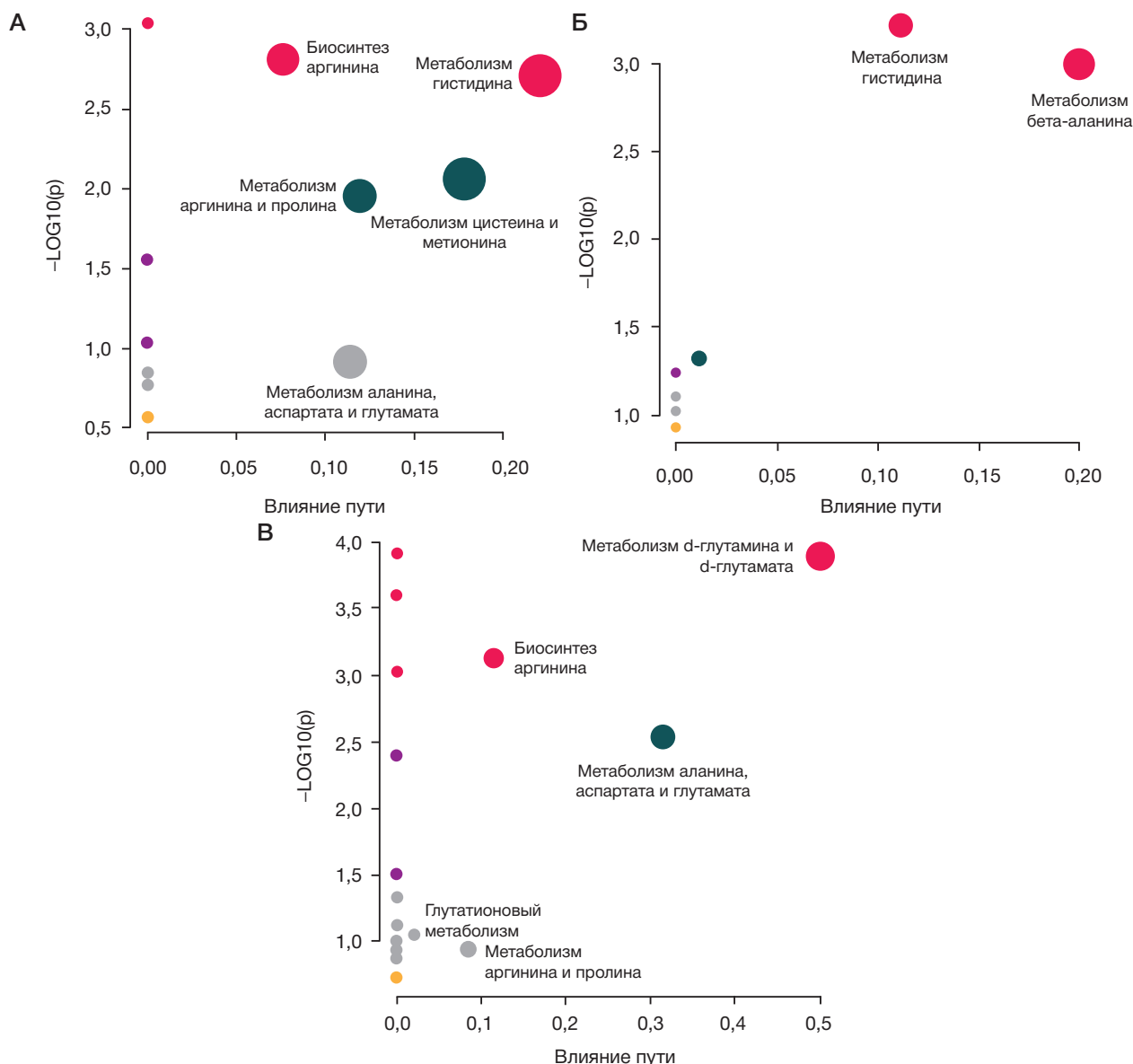


Рис. 4. Карта задействованности метаболических путей маркеров-аминокислот в исследованных образцах: амниотической жидкости (**А**); плазме пуповинной крови (**Б**); плазме венозной крови (**В**)

построенной на базе 1-метилгистидина, цистина, транс-4-гидроксипролина (табл. П6).

На следующем этапе работы был проведен анализ аминокислотного профиля пуповинной плазмы в двух группах. Статистический анализ полученных экспериментальных данных позволил выявить четыре аминокислоты, концентрации которых статистически значимо различались при COVID-19 (рис. 3, табл. П7): 1-метилгистидин, бета-аланин, цистин, гистидин.

Для пуповинной плазмы были также построены модели логистической регрессии аналогично описанным ранее (рис. П3 и в табл. П8, П9). Во все построенные модели вошел цистин — очевидно, как аминокислота, содержание которой наиболее различалось между группами. Для всех моделей AUC = 1, чувствительность и специфичность равны 1 (табл. П9).

Особый интерес представляло сравнение аминокислот в амниотической жидкости, венозной и пуповинной плазме, которые статистически значимо различаются в группах контроля и COVID-19. В трех точках (амниотическая жидкость, венозная и пуповинная плазма), комплексно отображающих метаболит системы мать– плод,

статистически значимо различались при COVID-19 концентрации двух аминокислот: 1-метилгистидина и цистеина. В двух точках (пуповинная и венозная плазма) статистически значимо отличалась одна аминокислота — глутамин (табл. П10).

Принимая во внимание выявление ряда повторяющихся аминокислот в трех биологических средах, отображающих комплекс мать–плод, подтвержденное статистически, для углубленного понимания данных результатов был осуществлен математический анализ включения данных аминокислот в метаболические пути и их возможное клиническое значение для беременной, плода и последующих потенциальных отдаленных результатов.

В работе использовали возможности ресурса MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) с подключенной библиотекой путей и соединений KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Аминокислоты, концентрации которых в амниотической жидкости статистически значимо различаются у пациенток с COVID-19 и без, не приводили к статистически значимой задействованности какого-либо метаболического пути (рис. 4А, табл. П11). Аминокислоты с различающимися

концентрациями в плазме пуповинной крови у пациенток с COVID-19 и без оказывают значимое влияние на метаболизм гистидина и β -аланина (рис. 4Б, табл. П12). Аминокислоты, концентрации которых различаются в плазме венозной крови, могут оказывать влияние на метаболизм *d*-глутамина и *d*-глутамата, биосинтез аргинина и метаболизм аланина, аспарата и глутамата (рис. 4В, табл. П13).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные свидетельствуют о статистически значимом различии концентраций восьми аминокислот в амниотической жидкости, пяти в венозной плазме и четырех в пуповинной плазме между пациентами с COVID-19 и в группе контроля. Стоит отметить, что концентрации восьми аминокислот были снижены у пациентов с COVID-19. Схожие изменения концентраций аминокислот были обнаружены при исследовании плазмы крови взрослых и детей с COVID-19 [14]. Авторы этой работы искали подтверждение своей гипотезе о возможном снижении концентрации аргинина при COVID-19. Известно, что эндотелиальная дисфункция играет роль в развитии повреждения легких при COVID-19 как у взрослых, так и у детей [17, 18], а низкая биодоступность аргинина связана с развитием эндотелиальной дисфункции и дисрегуляции Т-клеток [19, 20] и вносит вклад в патофизиологию множества заболеваний [21]. Действительно, у больных COVID-19 было обнаружено изменение концентрации аргинина. Кроме того, были значимо изменены и концентрации цитруллина, глутамина, аланина, глицина, гистидина, пролина и нескольких других аминокислот, однако авторы статьи затрудняются объяснить механизмы такого эффекта [14]. Снижение концентрации аминокислот было выявлено и при некоторых других патологиях [9, 11, 12, 14, 22, 23]. В нашей работе по данным анализа задействованности метаболических путей маркеров аминокислот в венозной плазме крови матерей с COVID-19 обнаружены статистически значимое изменение биосинтеза аргинина, значимое изменение путей метаболизма *d*-глутамина и *d*-глутамата и метаболизма аланина, аспарата и глутамата. Полузаменимая или условно незаменимая для человека аминокислота аргинин является одной из наиболее метаболически универсальных аминокислот и служит предшественником для синтеза мочевины, оксида азота, полиаминов, пролина, глутамата, креатина и агматина. Аргинин метаболизируется через сложный и строго регулируемый набор путей, которые остаются не до конца изученными как на уровне всего организма, так и на клеточном. Снижение концентрации аргинина в результате изменений активности аргиназы может избирательно изменять экспрессию определенных генов [24]. Нарушение экспрессии, ассоциированное с нарушением уровня аргинина в культивируемых клетках, известно уже более 40 лет [25].

На сегодняшний день установлено влияние аргинина на процессы регуляции и инициации экспрессии и транскрипции [26–29].

Особый интерес в нашем исследовании представляло сравнение аминокислот в амниотической жидкости, венозной и пуповинной плазме (трех средах), которые статистически значимо различаются в группах контроля и COVID-19. Значимо различались концентрации двух аминокислот: 1-метилгистидина и цистина. Одной из двух аминокислот, для которых были выявлены

различия сразу в трех средах, и обладающей высокой дифференцирующей значимостью, был L-цистин. Это некодируемая аминокислота, представляющая собой продукт окислительной димеризации цистеина. В ходе посттрансляционной модификации белков она играет крайне важную роль в формировании и поддержании третичной структуры белков и пептидов и, соответственно, их биологической активности. Например, такие гормоны, как вазопрессин, окситоцин, инсулин и соматостатин приобретают биологическую активность после образования внутримолекулярных дисульфидных мостиков.

Статистически значимая разница концентрации в амниотической жидкости и плазме венозной крови матери и пуповинной крови новорожденных от матерей с COVID-19 была выявлена для L-гистидина и его производного 1-метилгистидина.

Особый интерес представляет тот факт, что в результате нашего исследования анализ задействованности метаболических путей маркеров-аминокислот в плазме пуповинной крови новорожденных от матерей с COVID-19 также продемонстрировал статистически значимое изменение путей метаболизма гистидина и дополнительно β -аланина.

Встречающаяся в природе β -аминокислота β -аланин образуется путем деградации дигидроурацила и карнозина. Карнозин β -аланин и родственные дипептиды предотвращают перекисное окисление в мембранных системах, что позволяет считать их водорастворимым компонентом защитной системы клетки от окислительного повреждения наравне с жирорастворимыми мембраносвязанными антиоксидантами. Установлена их роль в деактивации активных форм кислорода и ненасыщенных альдегидов в реакциях пероксидации жирных кислот, входящих в состав мембран [30]. Пролиферативное действие данных аминокислот реализуется, скорее всего, только в мышечной и нервной тканях, состоящих из неделящихся клеток, и для них характерен самый сильный окислительный метаболизм. Можно предположить, что в добавление к известным активностям по отношению к мышечной ткани данные аминокислоты могут способствовать регенеративному ответу и стимулируют пролиферацию нормальных (неопухолевых) клеток человека.

Статистически значимая возможность влияния аминокислот с различающимися между исследуемыми группами концентрациями на метаболизм гистидина может демонстрировать связь между путем превращения гистидина с его декарбоксилированием и образованием гистамина и COVID-19 во время беременности.

Одна из 20 протеиногенных аминокислот, гетероциклическая α -аминокислота L-гистидин является одной из двух условно незаменимых аминокислот (наряду с аргинином). Первоначально считалось, что она незаменима только для детей. Остаток гистидина входит в состав активных центров множества ферментов. Гистидин является предшественником в биосинтезе гистамина. Гистамин играет важную роль в процессе воспаления и развития некоторых аллергических реакций. Гистидин способствует росту и восстановлению тканей, участвует в синтезе эритроцитов и лейкоцитов и в формировании миелиновых оболочек нервных клеток. Нехватка гистидина может ослабить слух, вызвать дегенеративные заболевания, такие как болезни Паркинсона и Альцгеймера.

Наши результаты показали, что вирус может вызывать выраженные изменения в метаболоме амниотической

жидкости и плазме пуповинной и венозной крови, что чревато риском нарушения программирования производства белковых молекул на всех уровнях системы мать–плод. При этом COVID-19 может никак не проявлять себя при рождении. Изменения метаболических процессов путем нарушения необходимого соотношения аминокислот на территории плода могут быть связаны с репликацией вируса, воспалительной реакцией хозяина и изменениями энергетического метаболизма, нарушением регуляции экспрессии и транскрипции белковых молекул. Оценка отдаленных последствий внутриутробного опосредованного воздействия COVID-19 на ребенка является важной задачей и приоритетным направлением последующих научных исследований.

ВЫВОДЫ

В данном исследовании мы использовали методы целевой метаболомики для обнаружения изменений концентрации аминокислот беременных, инфицированных COVID-19 в момент госпитализации. Обнаружено, что концентрации восьми аминокислот в амниотической жидкости (1-метилгистидин, 3-метилгистидин, аргинин, цистатионин, цистин, глутамин, гистидин, транс-4-гидроксипролин), пяти аминокислот в венозной плазме матерей (1-метилгистидин, лизин, цистин, глутаминадид и глутамин) и четырех аминокислот в пуповинной плазме (1-метилгистидин, β-аланин, цистин, гистидин) статистически значимо

различаются между группой пациентов, инфицированных COVID-19, и контрольной группой. Нарушение метаболизма выявленных аминокислот проявляется при ряде серьезных патологий, таких как острый респираторный дистресс-синдром у пациентов с тяжелым сепсисом, пневмония при гриппе H1N1, бактериальная пневмония, серповидноклеточная анемия, талассемия, малярия, острая астма, муковисцидоз, легочная гипертензия, сердечно-сосудистые заболевания, некоторые виды рака и др. По данным анализа задействованности метаболических путей маркеров-аминокислот в венозной и пуповинной плазме крови матерей и новорожденных в группе с COVID-19 обнаружено статистически значимое изменение биосинтеза и путей метаболизма ряда аминокислот, задействованных в реализации воспалительной реакции, изменений энергетического метаболизма, нарушений регуляции экспрессии и транскрипции белковых молекул и пр. Эти результаты могут быть использованы для дальнейших исследований возможных последствий для здоровья новорожденных COVID-19 у их матерей и определения требований к лечению и медицинской помощи беременным женщинам и новорожденным после постановки диагноза COVID-19, так как отдаленные последствия для здоровья данной когорты новорожденных могут включать в себя эндокринные, нервные и аллергические расстройства, обусловленные метаболомными нарушениями программирования производства белковых молекул в антенатальном периоде.

Литература

1. Chiu-Lin Wang, Yi-Yin Liu, Chin-Hu Wu, Chun-Yu Wang, Chun-Hung Wang, Cheng-Yu Long. Impact of COVID-19 on Pregnancy. *International Journal of Medical Sciences*. 2021; 18 (3): 763–7. DOI: 10.7150/ijms.49923.
2. Schwartz DA, Graham AL. Potential Maternal and Infant Outcomes from (Wuhan) Coronavirus 2019-nCoV Infecting Pregnant Women: Lessons from SARS, MERS, and Other Human Coronavirus Infections. *Viruses*. 2020; 12 (4): 194.
3. Zaigham M, Andersson O. Maternal and perinatal outcomes with COVID-19: A systematic review of 108 pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2020; 99 (7): 823–9.
4. Chen H, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*. 2020; 395 (10226): 809–15.
5. Sukhikh G, Petrova U, Prikhodko A, Starodubtseva N, Chingina K, Chen H, et al. Vertical Transmission of SARS-CoV-2 in Second Trimester Associated with Severe Neonatal Pathology. *Viruses*. 2021; 13 (3). DOI:10.3390/v13030447.
6. Ellington S, Strid P, Tong VT, Woodworth K, Galang RR, Zambrano LD, et al. Characteristics of women of reproductive age with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection by pregnancy status — United States, January 22–June 7, 2020. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2020; 69 (25): 769–5.
7. Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020; 11 (1). DOI: 10.1038/s41467020-17436-6.
8. Shen B, Yi X, Sun Y, Bi X, Du J, Zhang C, et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell*. 2020; 182 (1): 59–72.
9. McGarrath RW, Crown SB, Zhang G, Shah SH, M.H.S., Newgard CB. Cardiovascular Metabolomics. *Circ Res*. 2018; 122 (9): 1238–58. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311002.
10. Banoei MM, Vogel HJ, Weljie AM, Kumar A, Yende S, Angus DC, et al. Plasma metabolomics for the diagnosis and prognosis of H1N1 influenza pneumonia. 2017; 1–15.
11. Inoue S, Ikeda H. Differences in plasma amino acid levels in patients with and without bacterial infection during the early stage of acute exacerbation of COPD. *Int J COPD*. 2019; 14: 575–83.
12. Moat SJ, George RS, Carling RS. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *Int J Neonatal Screen*. 2020; 6 (2): 1–17.
13. Páez-Franco JC, Torres-Ruiz J, Sosa-Hernández VA, Cervantes-Díaz R, Romero-Ramírez S, Pérez-Fragoso A, et al. Metabolomics analysis reveals a modified amino acid metabolism that correlates with altered oxygen homeostasis in COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021; 11 (1). DOI: 10.1038/s41598-021-85788-0.
14. Rees CA, Rostad CA, Mantus G, Anderson EJ, Chahroudi A, Jaggi P. Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection. 2021; 118 (25): 4–6.
15. Hirschel J, Vogel M, Baber R, Garten A, Beuchel C, Dietz Y, et al. Relation of whole blood amino acid and acylcarnitine metabolome to age, sex, BMI, puberty, and metabolic markers in children and adolescents. *Metabolites*. 2020; 10 (4). DOI: 10.3390/metabo10040149.
16. Lomova NA, Chagovets VV, Dolgoplova EL, Novoselova AV, Petrova UL, Shmakov RG, et al. Changes in amino acid profile of cord blood plasma and amniotic fluid of mothers with COVID-19. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2021; (3): 12–22. DOI: 10.24075/BRSMU.2021.032
17. Diorio C, McNeerney KO, Lambert M, Paessler M, Anderson EM, Henrickson SE, et al. Evidence of thrombotic microangiopathy in children with SARS-CoV-2 across the spectrum of clinical presentations. *Blood Adv*. 2020; 4 (23): 6051–63.
18. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*. 2020; 20 (6): 363–74.
19. Gambardella J, Khondkar W, Morelli MB, Wang X, Santulli G, Trimarco V. Arginine and endothelial function. *Biomedicines*.

- 2020; 8 (8): 277.
20. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological Reviews*. 2008; 222 (1): 180–91.
 21. Morris CR, Hamilton-Reeves J, Martindale RG, Sarav M, Ochoa Gautier JB. Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine. In: *Nutrition in Clinical Practice*. SAGE Publications Inc., 2017; 30S–47S.
 22. IKEDA H. Plasma amino acid levels in individuals with bacterial pneumonia and healthy controls. 2020; 1–17.
 23. Ware LB, Magarik JA, Wickersham N, Cunningham G, Rice TW, Christman BW, et al. Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2013; 17 (1): 1–8.
 24. Morris SM Jr. Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83: 508S–12S.
 25. Schimke RT. Repression of enzymes of arginine biosynthesis in mammalian tissue culture. *Biochim Biophys Acta*. 1962; 62: 599–601.
 26. Jackson MJ, Allen SJ, Beaudet AL, O'Brien WE. Metabolite regulation of argininosuccinate synthetase in cultured human cells. *J Biol Chem*. 1988; 263: 16388–94.
 27. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM Jr, Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 4843–8.
 28. Taheri F, Ochoa JB, Faghiri Z, Culotta K, Park HJ, Lan MS, et al. L-Arginine regulates the expression of the T-cell receptor zeta chain (CD3zeta) in Jurkat cells. *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 958s–65s.
 29. Fernandez J, Lopez AB, Wang C, Mishra R, Zhou L, Yaman I, et al. Transcriptional control of the arginine/lysine transporter, cat-1, by physiological stress. *J Biol Chem*. 2003; 278: 50000–9.
 30. Cheng J, Wang F, Yu DF, Wu PF, Chen JG. The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *European Journal of Pharmacology*. 2011; 650, 184–94.
 1. Chiu-Lin Wang, Yi-Yin liu, Chin-Hu Wu, Chun-Yu Wang, Chun-Hung Wang, Cheng-Yu Long. Impact of COVID-19 on Pregnancy. *International Journal of Medical Sciences*. 2021; 18 (3): 763–7. DOI: 10.7150/ijms.49923.
 2. Schwartz DA, Graham AL. Potential Maternal and Infant Outcomes from (Wuhan) Coronavirus 2019-nCoV Infecting Pregnant Women: Lessons from SARS, MERS, and Other Human Coronavirus Infections. *Viruses*. 2020; 12 (4): 194.
 3. Zaigham M, Andersson O. Maternal and perinatal outcomes with COVID-19: A systematic review of 108 pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2020; 99 (7): 823–9.
 4. Chen H, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*. 2020; 395 (10226): 809–15.
 5. Sukhikh G, Petrova U, Prikhodko A, Starodubtseva N, Chingina K, Chen H, et al. Vertical Transmission of SARS-CoV-2 in Second Trimester Associated with Severe Neonatal Pathology. *Viruses*. 2021; 13 (3). DOI:10.3390/v13030447.
 6. Ellington S, Strid P, Tong VT, Woodworth K, Galang RR, Zambrano LD, et al. Characteristics of women of reproductive age with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection by pregnancy status — United States, January 22–June 7, 2020. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2020; 69 (25): 769–5.
 7. Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020; 11 (1). DOI: 10.1038/s41467020-17436-6.
 8. Shen B, Yi X, Sun Y, Bi X, Du J, Zhang C, et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell*. 2020; 182 (1): 59–72.
 9. McGarrah RW, Crown SB, Zhang G, Shah SH, M.H.S., Newgard CB. Cardiovascular Metabolomics. *Circ Res*. 2018; 122 (9): 1238–58. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311002.
 10. Banoei MM, Vogel HJ, Weljie AM, Kumar A, Yende S, Angus DC, et al. Plasma metabolomics for the diagnosis and prognosis of H1N1 influenza pneumonia. 2017; 1–15.
 11. Inoue S, Ikeda H. Differences in plasma amino acid levels in patients with and without bacterial infection during the early stage of acute exacerbation of COPD. *Int J COPD*. 2019; 14: 575–83.
 12. Moat SJ, George RS, Carling RS. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *Int J Neonatal Screen*. 2020; 6 (2): 1–17.
 13. Páez-Franco JC, Torres-Ruiz J, Sosa-Hernández VA, Cervantes-Díaz R, Romero-Ramírez S, Pérez-Fragoso A, et al. Metabolomics analysis reveals a modified amino acid metabolism that correlates with altered oxygen homeostasis in COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021; 11 (1). DOI: 10.1038/s41598-021-85788-0.
 14. Rees CA, Rostad CA, Mantus G, Anderson EJ, Chahroudi A, Jaggi P. Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection. 2021; 118 (25): 4–6.
 15. Hirschel J, Vogel M, Baber R, Garten A, Beuchel C, Dietz Y, et al. Relation of whole blood amino acid and acylcarnitine metabolome to age, sex, BMI, puberty, and metabolic markers in children and adolescents. *Metabolites*. 2020; 10 (4). DOI: 10.3390/metabo10040149.
 16. Lomova NA, Chagovets VV, Dolgoplova EL, Novoselova AV, Petrova UL, Shmakov RG, et al. Changes in amino acid profile of cord blood plasma and amniotic fluid of mothers with COVID-19. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2021; (3): 12–22. DOI: 10.24075/BRSMU.2021.032
 17. Diorio C, McNeerney KO, Lambert M, Paessler M, Anderson EM, Henrickson SE, et al. Evidence of thrombotic microangiopathy in children with SARS-CoV-2 across the spectrum of clinical presentations. *Blood Adv*. 2020; 4 (23): 6051–63.
 18. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*. 2020; 20 (6): 363–74.
 19. Gambardella J, Khondkar W, Morelli MB, Wang X, Santulli G, Trimarco V. Arginine and endothelial function. *Biomedicine*. 2020; 8 (8): 277.
 20. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological Reviews*. 2008; 222 (1): 180–91.
 21. Morris CR, Hamilton-Reeves J, Martindale RG, Sarav M, Ochoa Gautier JB. Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine. In: *Nutrition in Clinical Practice*. SAGE Publications Inc., 2017; 30S–47S.
 22. IKEDA H. Plasma amino acid levels in individuals with bacterial pneumonia and healthy controls. 2020; 1–17.
 23. Ware LB, Magarik JA, Wickersham N, Cunningham G, Rice TW, Christman BW, et al. Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2013; 17 (1): 1–8.
 24. Morris SM Jr. Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83: 508S–12S.
 25. Schimke RT. Repression of enzymes of arginine biosynthesis in mammalian tissue culture. *Biochim Biophys Acta*. 1962; 62: 599–601.
 26. Jackson MJ, Allen SJ, Beaudet AL, O'Brien WE. Metabolite regulation of argininosuccinate synthetase in cultured human cells. *J Biol Chem*. 1988; 263: 16388–94.
 27. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM Jr, Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 4843–8.
 28. Taheri F, Ochoa JB, Faghiri Z, Culotta K, Park HJ, Lan MS, et al. L-Arginine regulates the expression of the T-cell receptor zeta chain (CD3zeta) in Jurkat cells. *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 958s–65s.

29. Fernandez J, Lopez AB, Wang C, Mishra R, Zhou L, Yaman I, et al. Transcriptional control of the arginine/lysine transporter, cat-1, by physiological stress. *J Biol Chem*. 2003; 278: 50000–9.
30. Cheng J, Wang F, Yu DF, Wu PF, Chen JG. The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *European Journal of Pharmacology*. 2011; 650, 184–94.

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДОВ НА ОСНОВАНИИ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОТЫ ВЛАГАЛИЩА МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ В ПЕРВОМ ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ

Е. С. Ворошилина^{1,2}✉, Л. В. Хаютин², Е. В. Кудрявцева¹, В. В. Ковалев¹, Е. Э. Плотко²

¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

² Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Россия

Раннее выявление высокого риска развития преждевременных родов (ПР) дает возможность их предупреждения. Целью работы было разработать математическую прогностическую модель для оценки риска преждевременных родов на основании количественного анализа микробиоты влагалища в первом триместре беременности. В исследование было включено 199 беременных, из которых у 41-й беременность закончилась преждевременными родами, у 158 — срочными родами. Всем участницам проводили исследование микробиоты влагалища методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для разработки прогностической модели использовали метод дискриминантного анализа. Был разработан способ прогнозирования ПР с расчетом прогностического индекса ПРИМА (сокр. от «Преждевременные роды. Индекс микробиологического анализа»). Если значение ПРИМА > 0, риск ПР низкий, если ПРИМА < 0, риск высокий. Чувствительность и специфичность метода составляют соответственно 70,7 и 79,75%, эффективность — 77,89%. Оценка микробиоты влагалища в первом триместре дает возможность определения группы высокого риска ПР и проведения своевременных профилактических мероприятий.

Ключевые слова: микробиота влагалища, преждевременные роды, прогнозирование, ПЦР в реальном времени, дискриминантный анализ

Вклад авторов: Е. С. Ворошилина — организация исследования, выполнение ПЦР-РВ, анализ полученных данных, написание статьи; Л. В. Хаютин — организация исследования, отбор пациентов, анализ полученных данных, написание статьи; Е. В. Кудрявцева, В. В. Ковалев — статистическая обработка, анализ полученных данных, написание статьи; Е. Э. Плотко — организация исследования, отбор пациентов, анализ полученных данных, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России (протокол № 7 от 28 марта 2011 г.). Все участницы подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Для корреспонденции: Екатерина Сергеевна Ворошилина
ул. Тверитина, д. 16, г. Екатеринбург, 620100, Россия; voroshilina@gmail.com

Статья получена: 28.04.2022 Статья принята к печати: 22.05.2022 Опубликовано онлайн: 19.06.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.032

PREDICTING PRETERM BIRTH BASED ON VAGINAL MICROBIOTA ASSESSMENT BY REAL-TIME PCR IN THE FIRST TRIMESTER

Voroshilina ES^{1,2}✉, Khautin LV², Kudryavtseva EV¹, Kovalev VV¹, Plotko EE²

¹ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

² "Garmonia" Medical Center, Yekaterinburg, Russia

Detecting high risk of preterm birth (PB) early makes its prevention possible. The aim of the work was to develop a mathematical predictive model for assessing the risk of preterm birth based on a quantitative analysis of the vaginal microbiota in the first trimester of pregnancy. The study included 199 pregnant women, i.e. 41 pregnancies that ended in preterm birth, and 158 — in term birth. Vaginal microbiota was analyzed in all patients in the 1st trimester of pregnancy by quantitative real-time PCR (qPCR). The method of discriminant analysis was used to develop a predictive model. A method for predicting PB was developed with the calculation of the PRIMA prognostic index (Premature Birth. Index Of Microbiological Analysis). If the value of PRIMA > 0 — the risk of premature birth is low, if PRIMA < 0 — the risk is high. The sensitivity and specificity of the method are respectively 70.7% and 79.75%, the effectiveness is 77.89%. Evaluation of vaginal microbiota in the 1st trimester makes it possible to identify a high-risk group of PB and perform timely preventive measures.

Keywords: vaginal microbiota, premature birth, Femoflor-16, prediction, real-time PCR, discriminant analysis

Author contribution: Voroshilina ES — organization of the study, conducting real-time PCR, data analysis, writing the article; Khautin LV — organization of the study, data analysis, patient selection, writing the article; Kudryavtseva EV, Kovalev VV — statistical processing, data analysis, writing the article; Plotko EE — organization of the study, data analysis, patient selection, writing the article.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ural State Medical University, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education under the Ministry of Health of the Russian Federation (Protocol № 7 dated March 28, 2011). All patients signed the informed written consent to participation in the study.

✉ Correspondence should be addressed: Ekaterina S. Voroshilina
Tveritina, 16, Yekaterinburg, 620100, Russia; voroshilina@gmail.com

Received: 28.04.2022 Accepted: 22.05.2022 Published online: 19.06.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.032

Профилактика и ранняя диагностика гестационных осложнений имеют определяющее значение для уменьшения показателей материнской и младенческой смертности, а также для снижения уровня заболеваемости в течение всей дальнейшей жизни человека [1]. Преждевременные роды (ПР) являются причиной неонатальной смертности в 70% случаев, младенческой смертности — в 36%, отдаленных последствий в виде неврологических нарушений у детей — в 25–50% случаев [2], и следовательно, представляют не только медицинскую, но и социальную проблему во всем мире.

Преждевременными считают роды, наступившие в сроке беременности от 22 до 36,6 недель [2]. ПР относят к большим акушерским синдромам, которые характеризуются длительной доклинической стадией [1–5]. В России ПР составляют около 6% от общего числа родов [2]. В 70–80% случаев имеют место спонтанные ПР и лишь в 20–30% — индуцированные в связи с наличием показаний со стороны матери и/или плода [2, 3].

В последние годы широкую популярность приобрели взгляды, объединяющие ряд наиболее значимых осложнений беременности (преждевременные роды,

плацентарная недостаточность, синдром задержки роста плода, преэклампсия) в единую группу под названием «большие акушерские синдромы» [4, 5]. В основе этих патологических состояний лежат нарушения формирования плаценты уже на ранних этапах беременности, связанные с дефектами гестационной трансформации спиральных артерий, которые в свою очередь могут быть обусловлены рядом этиологических факторов (лютеиновая недостаточность, нарушения в формировании иммунологической толерантности, приобретенные или врожденные тромбофилии, непосредственные или опосредованные воздействия инфекционных агентов) [6, 7]. В клинической практике, как правило, наблюдается сложное сочетание нескольких этиологических факторов и патогенетических механизмов.

В клинических рекомендациях «Преждевременные роды» (2020 г.) отмечено, что научно доказана взаимосвязь ПР и инфекций половых путей (ИПП), которые в большинстве случаев протекают бессимптомно [2, 8]. Изменение микробиоты половых путей приводит к увеличению сократительной активности миометрия и деградации внеклеточного матрикса с ремоделированием шейки матки и амниотической мембраны [2, 8, 9].

Среди генитальных инфекционных заболеваний у беременных преобладают нарушения микробиоценоза влагалища. Более чем у половины женщин в течение беременности возникает хотя бы один эпизод генитальной патологии, связанной с дисбиотическими нарушениями [10]. Сама беременность является фактором риска развития патологии, вызываемой условно-патогенной микрофлорой и микроорганизмами со слабой вирулентностью и факторами агрессии [11].

В основе вагинального дисбиоза лежит дисбаланс между условно-патогенной и физиологической микрофлорой. Крайней степенью дисбаланса становится выраженный дисбиоз, необходимость коррекции которого не вызывает сомнений [12–14]. Состояние микробиоценоза влагалища, при котором доля лактофлоры находится в диапазоне 20–80% от ОБМ, расценивают как умеренный дисбиоз [15]. Является ли данный вариант нормальным или необходима коррекция, остается невыясненным в настоящее время.

Появление количественных молекулярно-биологических методов оценки существенно расширило представления о количественном и качественном составе микробиоты влагалища в норме и при патологии, в том числе при беременности [16].

В связи с длительной преคลินิกической стадией ПР нам представляется крайне актуальной разработка новых прогностических моделей этого состояния. Исследование микробиоты влагалища и своевременная коррекция у женщин группы высокого риска в перспективе могут привести к снижению частоты преждевременных родов и, следовательно, улучшению перинатальных исходов.

Целью исследования была разработка математической прогностической модели для оценки риска преждевременных родов на основании количественного анализа микробиоты влагалища в первом триместре беременности.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

В одноцентровое когортное ретроспективное сравнительное исследование было включено 199 пациенток, находившихся

на диспансерном наблюдении по поводу беременности в Медицинском центре «Гармония» (г. Екатеринбург) с 2012 по 2021 г.

Критерии включения и исключения

Критерии включения в основную группу: возраст 20–42 года, спонтанные преждевременные роды (в сроке беременности 28–36 недель), согласие на участие в исследовании.

Критерии включения в группу сравнения: возраст 20–42 года, срочные роды, согласие на участие в исследовании.

Критерии невключения: тяжелые эндокринные заболевания; артериальная гипертензия 2–3-й степени; заболевания щитовидной железы в стадии декомпенсации; коагулопатии; антифосфолипидный синдром; внутриматочные инфекционные процессы при беременности; тяжелые хронические заболевания (почек, печени, органов дыхания, сердечно-сосудистой системы, центральной нервной системы); психические заболевания; онкологические заболевания в анамнезе или в настоящее время; хроническая алкогольная или никотиновая интоксикация, употребление психоактивных веществ; пороки развития матки.

Критерии исключения: отказ женщины от участия в исследовании, наличие показаний для проведения индуцированных преждевременных родов или преждевременного оперативного родоразрешения, наличие инфекций половых путей, вызванных облигатными патогенами.

Группы обследованных пациенток

В исследуемую группу (группа 1) вошли пациентки, у которых беременность закончилась преждевременными родами ($n = 41$). Группу сравнения (группа 2) составили женщины с благополучным завершением беременности ($n = 158$).

Методы исследования

Всем участницам проводили клинико-лабораторное обследование, в соответствии с действующими стандартами ведения беременных, а также исследование микробиоты влагалища методом ПЦР-РВ на сроке 6–12 недель гестации (первый триместр). Материал для исследования собирали в пробирку Эппендорф, содержащую 1 мл стерильного физиологического раствора с заднебоковой стенки влагалища. ДНК выделяли с использованием комплекта реагентов ПРОБА-ГС («ДНК-Технология»; Россия), ПЦР-РВ проводили с использованием набора реагентов Фемофлор-16 («ДНК-Технология»; Россия) согласно инструкции производителя. Проводили типирование и определение количества 16 микроорганизмов. По результатам проведенного теста каждый образец влагалищного отделяемого был автоматически охарактеризован при помощи программного обеспечения, предоставляемого производителем.

Методы статистического анализа

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc.; США), Microsoft Excel 2016 и StatPlus:mac 8.0.3 (AnalystSoft; США). Проверку на нормальность

распределения проводили по критерию Колмогорова–Смирнова. Распределение не соответствовало нормальному. Для количественных показателей указывали значение медианы (Me) и интерквартильный размах (Q_1 – Q_3). Для оценки статистической значимости различий использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Для качественных показателей представляли абсолютные и относительные величины (%), статистическую значимость различий определяли с помощью критерия χ^2 . Силу ассоциации полученных величин оценивали в значениях показателя отношения шансов (ОШ) с 95%-ным доверительным интервалом (95% ДИ). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для формирования уравнения регрессии, которое легло в основу прогностической модели, использовали метод дискриминантного анализа с расчетом канонических коэффициентов дискриминантной функции (ККДФ). Для оценки эффективности предлагаемой прогностической модели был применен ROC-анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-анамнестическая характеристика обследованных

Первоначально было проведено сравнение групп по анамнестическим показателям. Учитывали данные соматического и акушерско-гинекологического анамнеза. Средний возраст обследованных составил $29,04 \pm 4,62$ лет для основной группы и $28,53 \pm 4,03$ лет для контрольной группы ($p > 0,05$). По массо-ростовым показателям различия были несущественными ($p > 0,05$). Частота выявления соматической патологии (заболеваний сердечно-сосудистой, мочевыводящей, дыхательной, нервной систем, эндокринопатий, патологии желудочно-кишечного тракта и аутоиммунных заболеваний) также не имела различий между группами ($p > 0,05$). Таким образом, группы оказались клинически сопоставимыми.

Анализ микробиоты влагалища

Состояние микробиоты влагалища оценивали методом ПЦР-РВ. В соответствии с ранее предложенными критериями [16] были выделены четыре варианта микробиоценоза влагалища, частота выявления которых различалась у беременных исследуемых групп (рис. 1).

В исследуемой группе дисбиоз различной степени выраженности был обнаружен у 16 (39,0%) пациенток, у 18 (11,39%) беременных — в группе сравнения ($\chi^2 = 17,457$; $p < 0,001$ [2.9E-5]). Значительно различалась частота выявления *Ureaplasma spp.* в количестве более 10^4

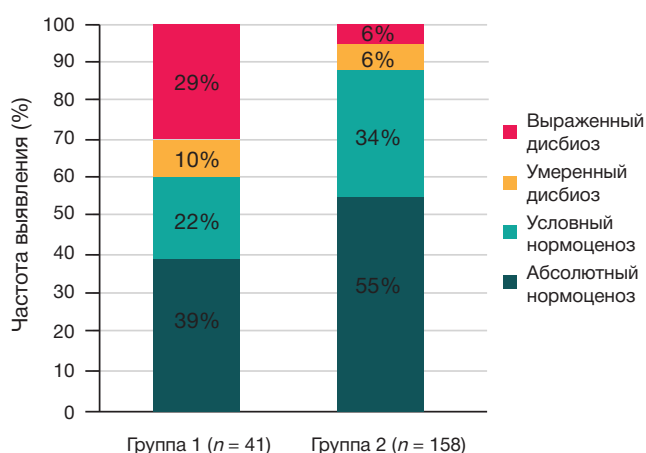


Рис. 1. Структура микробиоценоза влагалища в обследованных группах беременных ($\chi^2 = 19,066$; $p < 0,001$ [1.2E-5])

геномэквивалентов в мл (ГЭ/мл): у 18 (43,9%) в основной группе, у 39 (24,7%) — в группе сравнения ($\chi^2 = 5,853$; $p = 0,016$), причем в группе 1 дисбиоз в сочетании с *Ureaplasma spp.* в количестве более 10^4 ГЭ/мл выявлен у 11 (26,8%) женщин, а в группе сравнения — у 6 (3,8%) беременных ($\chi^2 = 21,991$; $p < 0,001$ [2.7E-6]). Частота выявления условного нормоценоза, ассоциированного с *Ureaplasma spp.* в количестве более 10^4 ГЭ/мл, не отличалась между группами. Не было также установлено статистически значимых различий по частоте выявления абсолютного нормоценоза и условного нормоценоза, ассоциированного с *Candida spp.*

Дискриминантный анализ

Для удобства оценки риска ПР и распределения беременных в группы низкого или высокого риска с учетом результатов исследования микробиоты влагалища методом ПЦР-РВ нами был разработан способ прогнозирования с расчетом прогностического индекса ПРИМА (сокр. от «Преждевременные роды. Индекс микробиологического анализа»). Для разработки прогностического индекса в полученных матрицах лабораторных показателей пациенток исследуемых групп проведен дискриминантный анализ.

Наиболее значимыми микроорганизмами в прогнозировании риска ПР оказались *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Sneathia spp.* / *Leptotrichia spp.* / *Fusobacterium spp.*, *Gardnerella vaginalis* / *Prevotella bivia* / *Porphyromonas spp.*, *Eubacterium spp.*, *Lachnobacterium spp.* / *Clostridium spp.*, *Mobiluncus spp.* / *Corynebacterium spp.*, *Ureaplasma spp.* Также учитывали общую бактериальную массу (ОБМ). Данные определяли в формате Lg ГЭ/мл. ККДФ представлены в табл. 1.

Таблица 1. ККДФ при расчете индекса ПРИМА

Параметр, Lg ГЭ/мл	Нестандартизованный ККДФ	Стандартизованный ККДФ
ОБМ	0,46	0,33
<i>Lactobacillus spp.</i>	–0,69	–0,76
<i>Staphylococcus spp.</i>	–0,28	–0,44
<i>Sneathia spp.</i> + <i>Leptotrichia spp.</i> + <i>Fusobacterium spp.</i> ,	0,04	0,07
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Prevotella bivia</i> + <i>Porphyromonas spp.</i>	0,15	0,29
<i>Eubacterium spp.</i>	0,2	0,36
<i>Lachnobacterium spp.</i> + <i>Clostridium spp.</i>	0,21	0,36
<i>Mobiluncus spp.</i> + <i>Corynebacterium spp.</i>	0,03	0,04
<i>Ureaplasma spp.</i>	0,03	0,06

Индекс ПРИМА рассчитывали по формуле:

$$\text{ПРИМА} = 0,25 - 0,49 \times X_1 + 0,74 \times X_2 - 0,16 \times X_3 - 0,22 \times X_4 - 0,04 \times X_5 - 0,22 \times X_6 - 0,03 \times X_7 - 0,03 \times X_8 + 0,3 \times X_9,$$

где X_1 — ОБМ, Лг ГЭ/мл;

X_2 — *Lactobacillus spp.*, Лг ГЭ/мл;

X_3 — *Gardnerella vaginalis* / *Prevotella bivia* / *Porphyromonas spp.*, Лг ГЭ/мл;

X_4 — *Eubacterium spp.*, Лг ГЭ/мл;

X_5 — *Sneathia spp.* / *Leptotrichia spp.* / *Fusobacterium spp.*, Лг ГЭ/мл;

X_6 — *Lachnobacterium spp.* / *Clostridium spp.*, Лг ГЭ/мл;

X_7 — *Mobiluncus spp.* / *Corynebacterium spp.*, Лг ГЭ/мл;

X_8 — *Ureaplasma spp.*, Лг ГЭ/мл;

X_9 — *Staphylococcus spp.*, Лг ГЭ/мл;

Если значение ПРИМА > 0 , риск преждевременных родов низкий, если ПРИМА < 0 , риск высокий.

Среднее значение ПРИМА в группах 1 и 2 составило соответственно $-0,39$ ($-1,43 - 0$) и $0,33$ ($-0,15 - 0,84$). Различия статистически значимы ($p < 0,001$) (рис. 2).

Для оценки эффективности представленного способа прогнозирования был проведен ROC-анализ. ROC-кривая для индекса ПРИМА представлена на рис. 3. Площадь под кривой (area under curve, AUC) составила $0,76$ (95% ДИ: $0,68 - 0,84$), что соответствует хорошему качеству модели прогнозирования.

Для определения чувствительности и специфичности представленного способа прогнозирования использовали экзаменационную выборку. Показатели чувствительности и специфичности составили соответственно $70,7$ и $79,75\%$, эффективность способа — $77,89\%$ (табл. 2).

Чувствительность и специфичность при различных значениях индекса ПРИМА представлены на рис. 4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно данным предшествующих исследований, для благополучного течения и завершения беременности в срок наиболее благоприятен лактобациллярный вариант вагинальной микробиоты, который устанавливается к началу второго триместра [17]. При этом состояние нормоценоза у таких беременных, как правило, сохраняется во втором и третьем триместрах [18]. В нашем исследовании мы не выявили статистически значимых различий по частоте встречаемости в первом триместре беременности абсолютного нормоценоза и относительного нормоценоза, однако было показано, что выраженный дисбиоз — это фактор риска преждевременных родов: в группе 1 он встречался существенно чаще.

Присутствие разнообразных условно-патогенных микроорганизмов, особенно из числа ассоциированных с бактериальным вагинозом, в составе вагинальной микробиоты прогностически неблагоприятно [17]. Попытки коррекции бактериального вагиноза во время беременности часто безуспешны, а доказанная элиминация *G. vaginalis* не снижает риска ПР за счет сохранения других облигатно анаэробных бактерий на фоне пониженной доли лактофлоры [12]. В некоторых научных работах ранее было показано, что наличие *Ureaplasma spp.* в высоком титре — это фактор риска ПР [19]. В нашей работе мы подтвердили эти данные: в основной группе частота выявления *Ureaplasma spp.* в количестве более 10^4 ГЭ/мл была существенно выше. Причем в группе 1 дисбиоз в сочетании с *Ureaplasma spp.* в количестве более 10^4 ГЭ/мл выявлен у 11 ($26,8\%$) женщин, а в группе сравнения — у шести ($3,8\%$) беременных ($\chi^2 = 21,991$; $p < 0,001$). Частота выявления

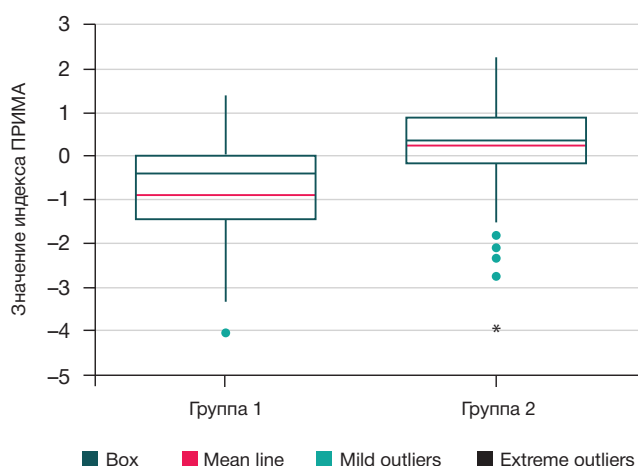


Рис. 2. Значение индекса ПРИМА в исследуемых группах

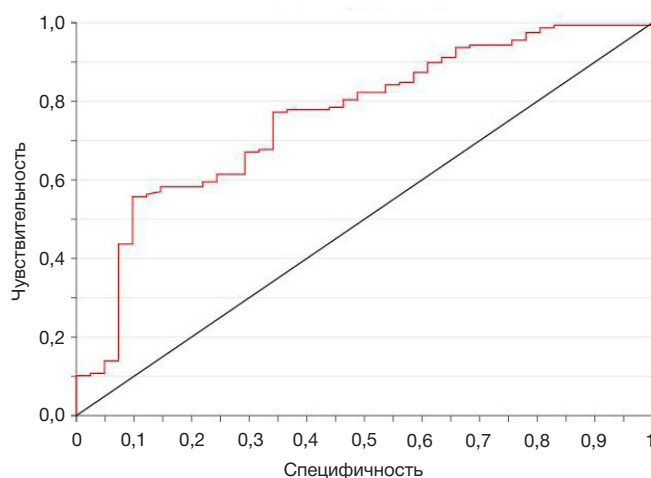


Рис. 3. ROC-кривая индекса ПРИМА

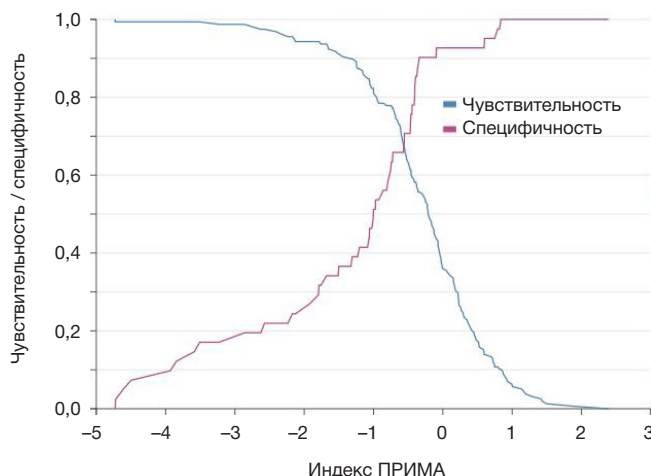


Рис. 4. Чувствительность и специфичность при различных значениях индекса ПРИМА

условного нормоценоза, ассоциированного с *Ureaplasma spp.* в количестве более 10^4 ГЭ/мл, не различалась между группами. Вероятно, наличие *Ureaplasma spp.* имеет наибольшее значение при наличии дисбиоза.

Наличие других условно патогенных микроорганизмов существенного самостоятельного значения не имеет, однако в совокупности они могут способствовать формированию микробиоценоза влагалища, повышающего либо снижающего риск ПР. Для эффективного прогнозирования данного состояния необходима комплексная оценка.

Таблица 2. Чувствительность и специфичность индекса ПРИМА

Группа / Прогноз	1	2	Всего	Число правильных, %
1	29	12	41	70,7
2	32	126	158	79,75
Всего	61	138	199	77,89

Ранее была предпринята попытка разработки прогностической модели для оценки риска ПР по результатам исследования микробиоты влагалища [17]. Однако авторы использовали метод NGS-секвенирования (целевой участок бактериального генома — ген 16S рРНК). При высокой информативности этот подход обладает рядом недостатков: сложной пробоподготовкой, трудностью контроля отбора материала, длительной продолжительностью анализа, сложностью интерпретации результатов, высокой стоимостью приборной базы и реагентов для исследования. Данные недостатки делают практически невозможным применение NGS-секвенирования в рутинной врачебной практике. Для этой цели гораздо более удобен метод ПЦР в реальном времени.

На этом основании нами разработан метод прогноза недонашивания беременности с учетом данных о качественном и количественном составе вагинальной микробиоты беременных женщин, полученных с помощью ПЦР-РВ. Новизна предлагаемого способа заключается в том, что впервые исключительно на основании качественного и количественного состава микробиоты влагалища проводится высокoeffективное прогнозирование преждевременных родов. Предлагаемый прогностический индекс ПРИМА учитывает вклад восьми из 16 определяемых параметров в формирование сложного микробного сообщества, населяющего влагалище. Примечательно, что помимо *G. vaginalis*, которую традиционно связывают с повышенным риском ПР [17], в формировании прогностического индекса значение имели еще четыре группы облигатных анаэробов. Данный факт подчеркивает целесообразность комплексного изучения микробиоты влагалища с оценкой значимости всех потенциально присутствующих микроорганизмов.

Ограничением настоящего исследования является исключение из числа параметров, используемых для составления прогностического индекса, клинико-анамнестических данных и результатов других исследований. Мы понимаем, что преждевременное завершение гестации происходит не только в связи с нарушениями микробиоты влагалища, но и в силу иных причин. Поэтому возможно повышение чувствительности и специфичности прогностической модели за счет включения дополнительных маркеров.

ВЫВОДЫ

Разработанная нами прогностическая модель дает возможность раннего выявления беременных группы риска преждевременных родов на основании комплексной оценки микробиоты влагалища методом ПЦР в реальном времени в первом триместре беременности. Использование предлагаемого прогностического индекса ПРИМА обосновывает необходимость коррекции дисбиоза влагалища уже в первом триместре беременности для снижения рисков развития преждевременных родов и, следовательно, снижения перинатальной заболеваемости и смертности. Выделение пациенток группы риска по преждевременным родам на основании расчета индекса ПРИМА создает предпосылки использования у них уже известных профилактических методов, например, назначение вагинального микронизированного прогестерона с 22-й по 34-ю неделю беременности [2]. Предлагаемый метод прогноза можно широко использовать в клинической практике, он не требует значительных материальных затрат и организационных усилий.

Литература

1. Кудрявцева Е. В. «Большие акушерские синдромы»: патогенез, прогнозирование, тактика [диссертация]. М., 2020.
2. Преждевременные роды. Клинические рекомендации. М.: Министерство здравоохранения РФ, 2020; 66 с.
3. Ananth CV, Vintzileos AM. Medically indicated preterm birth: recognizing the importance of the problem. Clin Perinatol. 2008; 35 (1): 53–67.
4. Romero R. Prenatal medicine: The child is the father of the man. J Matern Fetal Neonatal Med. 2009; 22 (8): 636–9.
5. Di Renzo GC. The great obstetrical syndromes. J Matern Fetal Neonatal Med. 2009; 22: 633–5.
6. Tosto V, Giardina I, Tsimbiza V, Di Renzo GC. Preterm Birth, from the biological knowledges to the prevention: an overview, maternal-fetal medicine. 2020; 2 (3): 162–71. DOI: 10.1097/FM9.0000000000000054.
7. Tantengco OAG, Menon R. Breaking down the barrier: the role of cervical infection and inflammation in preterm birth. Front Glob Womens Health. 2022; 2: 777643. DOI: 10.3389/fgwh.2021.777643.
8. Kemp MW. Preterm birth, intrauterine infection, and fetal inflammation. Front Immunol. 2014; 5: 574.
9. Keelan JA. Intrauterine inflammatory activation, functional progesterone withdrawal, and the timing of term and preterm birth. J Reprod Immunol. 2018; 125: 89–99.
10. Хаятин ЛВ, Плотко ЕЭ, Ворошилина ЕС. Анаэробный дисбиоз влагалища во время беременности: особенности течения и возможности коррекции. Уральский медицинский журнал. 2016; 2 (135): 55–60.
11. Стрижаков А. Н., Буданов П. В. Состояние микроценоза влагалища и способы коррекции его нарушений во время беременности. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2007; 5: 37–43.
12. Shimaoka M, Yo Y, Doh K, Kotani Y, Suzuki A, Tsuji I, et al. Association between preterm delivery and bacterial vaginosis with or without treatment. Sci Rep. 2019; 9 (1): 509. DOI: 10.1038/s41598-018-36964-2.
13. Han Y, Liu Z, Chen T. Role of Vaginal Microbiota Dysbiosis in Gynecological Diseases and the Potential Interventions. Front Microbiol. 2021; 12: 643422. DOI: 10.3389/fmicb.2021.643422.
14. Клинические рекомендации по диагностике и лечению заболеваний, сопровождающихся патологическими выделениями из половых путей женщин. Российское общество акушеров-гинекологов. М., 2019; 57 с.
15. Ворошилина Е. С., Плотко Е. Э., Хаятин Л. В., Тищенко Н. А., Зорников Д. Л. Преобладание *Lactobacillus iners* в микробиоценозе

влагалища женщин с умеренным дисбиозом ассоциировано с наличием клинических признаков инфекционно-воспалительной патологии влагалища. Вестник РГМУ. 2017; 2: 47–51.

16. Ворошилина Е. С., Тумбинская Л. В., Донников А. Е., Плотко Е. Э., Хаютин Л. В. Биocenоз влагалища с точки зрения количественной полимеразной цепной реакции: что есть норма? Акушерство и гинекология. 2011; 1: 57–65.
17. Fettweis JM, Serrano MG, Brooks JP, Edwards DJ, Girerd PH, Parikh HI et al. The vaginal microbiome and preterm birth. Nat


Med. 2019; 25: 1012–21.

18. Ворошилина Е. С., Тумбинская Л. В., Донников А. Е., Плотко Е. Э., Хаютин Л. В. Биocenоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: изменения и коррекция во время беременности. Уральский медицинский журнал. 2010; 3 (68): 105–12.
19. Kikhney J, von Schöning D, Steding I, Schulze J, Petrich A, Hiergeist A, et al. Is Ureaplasma spp. the leading causative agent of acute chorioamnionitis in women with preterm birth? Clinical Microbiology and Infection. 2017; 23 (2): 119.e1–119.e7.

References

1. Kudryavtseva EV «Bol'shie akusherskie sindromy»: patogenez, prognozirovaniye, taktika [dissertatsiya]. M., 2020. Russian.
2. Prezhdvremennyye rody. Klinicheskie rekomendatsii. M.: Ministerstvo zdoravooxraneniya RSFSR, 2020; 66 s. Russian.
3. Ananth CV, Vintzileos AM. Medically indicated preterm birth: recognizing the importance of the problem. Clin Perinatol. 2008; 35 (1): 53–67.
4. Romero R. Prenatal medicine: The child is the father of the man. J Matern Fetal Neonatal Med. 2009; 22 (8): 636–9.
5. Di Renzo GC. The great obstetrical syndromes. J Matern Fetal Neonatal Med. 2009; 22: 633–5.
6. Tosto V, Giardina I, Tsibizova V, Di Renzo GC. Preterm Birth, from the biological knowledges to the prevention: an overview, maternal-fetal medicine. 2020; 2 (3): 162–71. DOI: 10.1097/FM9.0000000000000054.
7. Tantengco OAG, Menon R. Breaking down the barrier: the role of cervical infection and inflammation in preterm birth. Front Glob Womens Health. 2022; 2: 777643. DOI: 10.3389/fgwh.2021.777643.
8. Kemp MW. Preterm birth, intrauterine infection, and fetal inflammation. Front Immunol. 2014; 5: 574.
9. Keelan JA. Intrauterine inflammatory activation, functional progesterone withdrawal, and the timing of term and preterm birth. J Reprod Immunol. 2018; 125: 89–99.
10. Khautin LV, Plotko EEh, Voroshilina ES. Anaerobnyy disbioz vlagalishha vo vremya beremennosti: osobennosti techeniya i vozmozhnosti korrektsii. Ural'skij medicinskij zhurnal. 2016; 2 (135): 55–60.
11. Strizhakov AN, Budanov PV. Sostoyaniye mikrotsenoza vlagalishha i sposoby korrektsii ego narusheniy vo vremya beremennosti. Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii. 2007; 5: 37–43. Russian.
12. Shimaoka M, Yo Y, Doh K, Kotani Y, Suzuki A, Tsuji I, et al. Association between preterm delivery and bacterial vaginosis with or without treatment. Sci Rep. 2019; 9 (1): 509. DOI: 10.1038/s41598-018-36964-2.
13. Han Y, Liu Z, Chen T. Role of Vaginal Microbiota Dysbiosis in Gynecological Diseases and the Potential Interventions. Front Microbiol. 2021; 12: 643422. DOI: 10.3389/fmicb.2021.643422.
14. Klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu zabolevaniy, soprovozhdayushhixsya patologicheskimi vydeleniyami iz polovyyx putej zhenshin. Rossiyskoe obshchestvo akusherov-ginekologov. M., 2019; 57 s. Russian.
15. Voroshilina ES, Plotko EEh, Khautin LV, Tishhenko NA, Zornikov DL. Preobladaniye Lactobacillus iners v mikrobiotsenoze vlagalishha zhenshin s umerennym disbiozom assotsiirovano s nalichiem klinicheskix priznakov infektsionno-vospalitel'noy patologii vlagalishha. Vestnik RGMU. 2017; 2: 47–51. Russian.
16. Voroshilina ES, Tumbinskaya LV, Donnikov AE, Plotko EEh, Khautin LV. Biocenoz vlagalishha s tochki zreniya kolichestvennoy polimeraznoy cepnoy reaktsii: chto est' norma? Akusherstvo i ginekologiya. 2011; 1: 57–65. Russian.
17. Fettweis JM, Serrano MG, Brooks JP, Edwards DJ, Girerd PH, Parikh HI et al. The vaginal microbiome and preterm birth. Nat Med. 2019; 25: 1012–21.
18. Voroshilina ES, Tumbinskaya LV, Donnikov AE, Plotko EEh, Khautin LV. Biocenoz vlagalishha s tochki zreniya kolichestvennoy PCR: izmeneniya i korrektsiya vo vremya beremennosti. Ural'skij medicinskij zhurnal. 2010; 3 (68): 105–12. Russian.
19. Kikhney J, von Schöning D, Steding I, Schulze J, Petrich A, Hiergeist A, et al. Is Ureaplasma spp. the leading causative agent of acute chorioamnionitis in women with preterm birth? Clinical Microbiology and Infection. 2017; 23 (2): 119.e1–119.e7.

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО У БОЛЬНЫХ С РАЗНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ

М. В. Завьялова^{1,2}, Д. М. Лоос¹, Д. С. Письменный^{1,2} , А. А. Дурова¹, О. В. Панкова², Е. О. Родионов², С. А. Тузиков^{1,2}, Л. А. Таширева², В. М. Перельмутер²

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия


² Научно-исследовательский институт онкологии Томского научно-исследовательского медицинского центра, Томск, Россия

По данным мировой статистики, рак легких занимает ведущие позиции в структуре онкологических заболеваний. Несмотря на значительные достижения в лечении, выживаемость остается низкой. Изучение ассоциации морфологических изменений бронхиального эпителия, смежных с опухолью у пациентов с раком легкого, может привести к значимому вкладу в понимание прогрессии опухоли. Целью работы было выявить особенности морфологического строения и прогрессии немелкоклеточного рака легких, ассоциированные с характером изменений эпителия в мелких бронхах, смежных с опухолью. В исследование был включен операционный материал от 90 пациентов с диагнозом немелкоклеточный рак легкого. Средний возраст пациентов составил $67,8 \pm 7,4$ лет. Мужчин было 75 (83%), женщин — 15 (17%). Выявлена высокая частота развития лимфогенного метастазирования в группе пациентов с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+) по сравнению с группой, где выявлена только базальноклеточная гиперплазия (БКГ+ПМ-) ($p = 0,05$). Частота встречаемости гематогенных метастазов была выше в группе с БКГ+ПМ- по сравнению с БКГ+ПМ+ ($p = 0,004$) и БКГ-ПМ- ($p = 0,0019$). В то же время в группе высокого риска гематогенного метастазирования (БКГ+ПМ-) в первичных опухолях чаще встречаются низкодифференцированные структуры. Результаты исследования позволяют предполагать о наличии ассоциации паренхиматозно-стромальных отношений в мелких бронхах опухоленосителей и в опухоли и их связи со степенью дифференцировки НМРЛ и с его прогрессией.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, опухолевая гетерогенность, базальноклеточная гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия, метастазирование

Вклад авторов: Д. С. Письменный — анализ литературы, написание текста; Е. О. Родионов, С. А. Тузиков — проведение операции и набор операционного материала; О. В. Панкова, Д. М. Лоос, А. А. Дурова — морфологическое исследование первичной опухоли и бронхов; Л. А. Таширева — статистическая обработка результатов; М. В. Завьялова, В. М. Перельмутер — планирование концепции, окончательное редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 5600 от 23 октября 2017 г.).

 **Для корреспонденции:** Дмитрий Сергеевич Письменный
Кооперативный переулок, д. 5, г. Томск, 634009, Россия; pismenniy.dmitry@gmail.com

Статья получена: 04.05.2022 **Статья принята к печати:** 02.06.2022 **Опубликована онлайн:** 15.06.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.030

CLINICAL AND MORPHOLOGICAL FEATURES OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER IN PATIENTS WITH DIFFERENT TYPES OF HISTOLOGICAL CHANGES TO THE BRONCHIAL EPITHELIUM

Zavyalova MV^{1,2}, Loos DM¹, Pismenny DS^{1,2} , Durova AA¹, Pankova OV², Rodionov EO², Tuzikov SA^{1,2}, Tashireva LA², Perelmutter VM²

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

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

Lung cancer occupies the leading position in the global structure of oncological diseases. Despite significant advances in its treatment, the survival remains low. Morphological changes to the bronchial epithelium outside the tumor may provide important cues on progression of the disease in patients with lung cancer. This study aimed to identify associations between morphological and clinical features of non-small cell lung cancer and morphological changes to the epithelium in small bronchi outside the tumor. The study encompassed tumor specimens collected from 90 patients, 75 (83%) men and 15 (17%) women, diagnosed with non-small cell lung cancer. The average age of the patients was 67.8 ± 7.4 years. The results indicate higher frequency of lymphogenous metastasis in patients with combined basal cell hyperplasia and squamous metaplasia (BCH+SM+ group) compared to patients with isolated basal cell hyperplasia (BCH+SM- group, $p = 0.05$). The BCH+SM- group presented with higher rates of hematogenous metastasis compared to BCH+SM+ and BCH-SM- groups ($p = 0.004$ and $p = 0.0019$, respectively), as well as increased representation of low-differentiated structures in the primary tumors. The results suggest a commonality of parenchymal-stromal interactions in non-small cell lung cancers and their surroundings and a significant impact of these interactions on differentiation status and progression of the tumors.

Keywords: non-small cell lung cancer, tumor heterogeneity, basal cell hyperplasia, squamous cell metaplasia, metastasis

Author contribution: Pismenny DS — analysis of the literature and writing of the text; Rodionov EO, Tuzikov SA — surgery and tumor specimen collection; Pankova OV, Loos DM, Durova AA — morphological study; Tashireva LA — statistical processing of the data; Zavyalova MV, Perelmutter VM — concept and design, scientific editing of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review Board at the Siberian State Medical University (Protocol No. 5600 of 23 October 2017).

 **Correspondence should be addressed:** Dmitry S. Pismenny
Kooperativny pereulok, 5, Tomsk, 634009, Russia; pismenniy.dmitry@gmail.com

Received: 04.05.2022 **Accepted:** 02.06.2022 **Published online:** 15.06.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.030

Рак легких занимает первое место, как в мире, так и в России по смертности населения от онкологической патологии [1].

До сих пор идет поиск дополнительных параметров прогноза течения рака легкого и продолжается изучение вопросов канцерогенеза новообразований данной локализации. С этой точки зрения представляется перспективным изучение состояния бронхиального эпителия у пациентов, страдающих раком легкого, поскольку именно бронхиальный эпителий в этой группе больных является основной точкой канцерогенных воздействий.

Ранее сообщалось о значении исследования гиперпластических процессов в мелких бронхах, располагающихся на некотором отдалении от первичной опухоли, в связи с тем, что уже при гиперплазии бронхиального эпителия в клетках имеются генетические изменения, имеющие существенное значение в канцерогенезе и реализующиеся в последующем в неопластических процессах [2, 3].

Патогенез развития плоскоклеточной карциномы легких на фоне имеющихся гиперпластических изменений бронхиального эпителия связывают с влиянием воспалительного процесса, с нарушением механизмов регуляции клеточного цикла, апоптозом, нарушением дифференцировки клеток [4].

Первым шагом в изменении бронхиального эпителия является базальноклеточная гиперплазия (БКГ), обусловленная ускоренной регенерацией с одновременным замедлением дифференцировки клеток в условиях хронического воспаления [5]. Базальноклеточной гиперплазией считают изменения, когда количество рядов клеток достигает трех [6].

При базальноклеточной гиперплазии бронхиального эпителия базальные клетки имеют более трех слоев, при этом в клетках отсутствуют признаки атипии, межклеточные «мостики», ороговение и сохраняются реснички на поверхности клеток [7, 8].

Повышение уровня экспрессии маркеров пролиферативной активности и апоптоза (Ki67, bcl-2, p53) отмечается уже при базальноклеточной гиперплазии [5, 9].

Плоскоклеточная метаплазия (ПМ) — это процесс, при котором цилиндрический мерцательный респираторный эпителий замещается зрелым плоским эпителием. Клетки поверхностного слоя эпителиального пласта расположены параллельно базальной мембране, без атипии или с минимально выраженной атипией, между ними присутствуют межклеточные мостики. Для плоскоклеточной метаплазии характерно созревание клеток базального слоя и сохранение зоны промежуточных клеток [10].

Базальноклеточная гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия часто предшествуют неоплазии и/или инвазивному плоскоклеточному раку [6, 11].

Имеются сведения о сочетании определенного состояния бронхиального эпителия с диспластическими и опухолевыми процессами в легком. Так, дисплазия бронхиального эпителия крайне редко сочетается с базальноклеточной гиперплазией независимо от наличия или отсутствия плоскоклеточной метаплазии. У пациентов с аденокарциномой легкого редко обнаруживают базальноклеточную гиперплазию и плоскоклеточную метаплазию [2].

Кроме патогенетического значения для возникновения первичной опухоли, базальноклеточная гиперплазия и

плоскоклеточная метаплазия могут быть индикаторами, ассоциированными с большей частотой встречаемости некоторых форм опухолевой прогрессии при немелкоклеточном раке легкого. Так, сочетание базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии без дисплазии в мелких бронхах часто обнаруживают в случаях с наличием рецидивов [12]. С изолированной базальноклеточной гиперплазией ассоциирован высокий риск развития гематогенных метастазов [13].

Подобную связь можно объяснить многообразными иммунными стромальными реакциями, обусловленными генетической детерминацией и играющими ключевую роль в различных типах эпителиально-стромальных взаимодействий. Предполагается, что иммунно-стромальные реакции в бронхах могут быть связаны с особенностями микроокружения опухоли [14].

Цель исследования — изучить особенности морфологического строения и прогрессии немелкоклеточного рака легких, ассоциированные с характером изменений эпителия в мелких бронхах, смежных с опухолью.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали операционный материал от 90 больных немелкоклеточным раком легкого T1-3N0-2M0, проходивших лечение в торакоабдоминальном отделении НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2009 по 2017 г. Критерии включения в исследование: наличие информированного добровольного согласия; наличие злокачественной эпителиальной опухоли (плоскоклеточный рак, аденокарцинома). Критерии исключения: отказ от участия в исследовании; наличие хронических процессов (туберкулез, гепатит С); наличие мелкоклеточного рака. Распространенность заболевания определяли согласно международной классификации по системе TNM [15]. Оперативное лечение выполняли в объеме лобэктомии с ипсилатеральной медиастенальной лимфодиссекцией без неоадьювантной химиотерапии или интраоперационной лучевой терапии. По показаниям пациентам выполняли адьювантную терапию по схемам: винорелбин, цисплатин (25–30 мг/м² в первый и восьмой дни цикла, 75–80 мг/м² в/в — в первый день цикла; цикл — 21 день) или паклитаксел, карбоплатин (200 мг/м² в/в в первый день цикла, AUC 6 в/в в первый день цикла; цикл — 21 день).

Для морфологической оценки операционного материала использовали световой микроскоп Axio Lab. A1 (Zeiss; Германия) и сканирующий микроскоп Mirax Midi (Zeiss; Германия). Материал фиксировали в 10–12%-м растворе нейтрального формалина. Подготовку материала (обезвоживание и пропитку в парафине) и изготовление гистологических препаратов осуществляли по стандартной методике. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

Гистотип рака устанавливали согласно классификации WHO [16]. В исследование включали только случаи с плоскоклеточной карциномой и аденокарциномой. Для верификации диагноза плоскоклеточной карциномы и аденокарциномы выполняли иммуногистохимическое исследование с использованием антител к TTF (клон SPT24, Novocastra; Leica Biosystems, Великобритания), Napsin A (клон NCL-L, Novocastra; Leica Biosystems, Великобритания), p63 (клон 7JUL, Novocastra; Leica Biosystems, Великобритания), Cytokeratin 7 (клон OV-TL 12/30, Novocastra; Leica Biosystems, Великобритания),

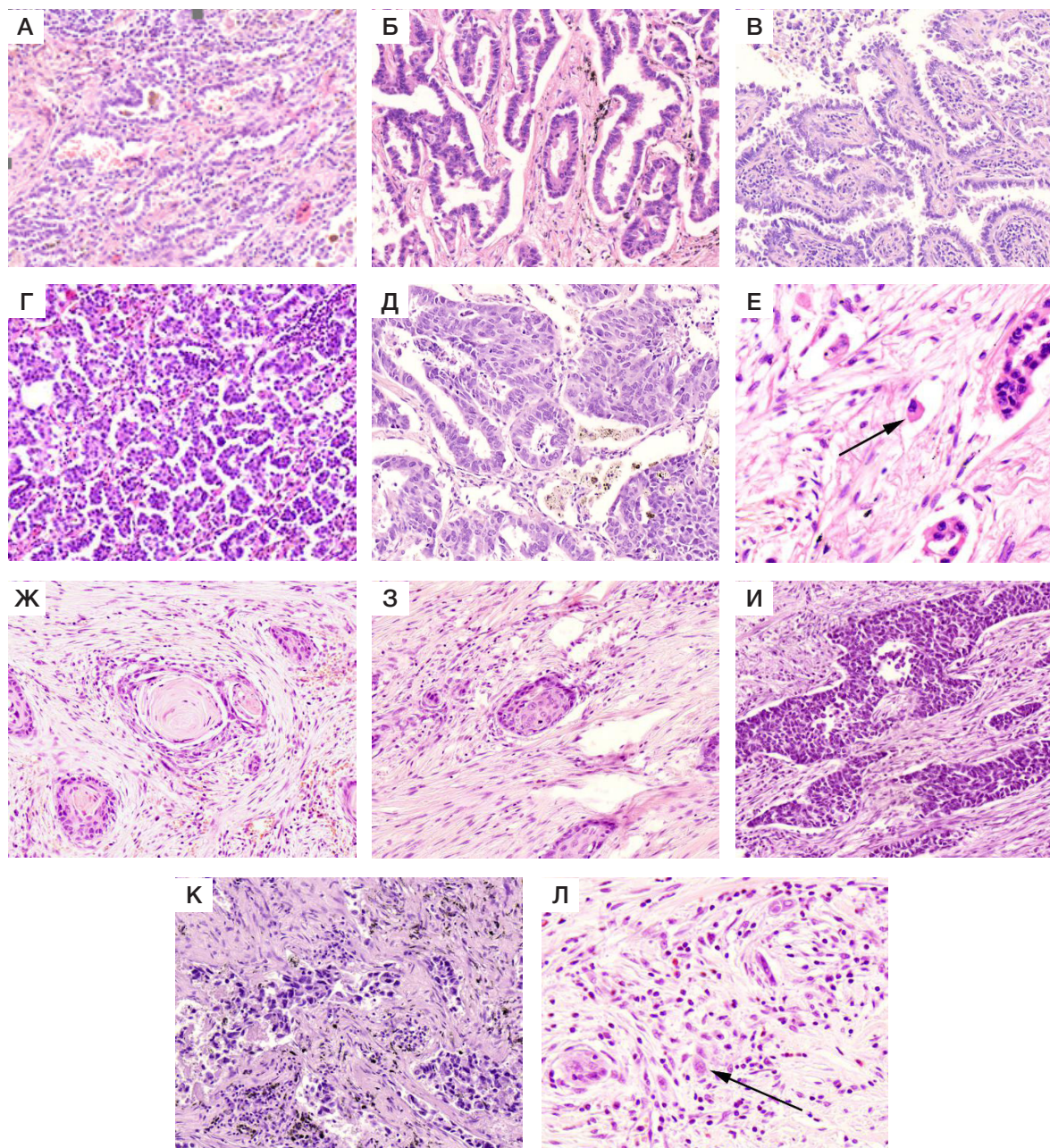


Рис. 1. Морфологические типы структур паренхиматозного компонента первичной опухоли: аденокарциномы (lepidic (А), ацинарный (Б), папиллярный (В), микропапиллярный (Г), солидный (Д)), отдельные опухолевые клетки (Е) и плоскоклеточной карциномы (I тип (Ж), II тип (З), III тип (И), IV тип (К), V тип (Л)) (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$)

Cytokeratine 5/6 (клон D5/16, Dako; Agilent, Дания). Иммуногистохимическое исследование осуществляли по стандартной методике. В случаях с аденокарциномой обнаружены позитивная экспрессия Cytokeratine 7, TTF, Napsin A и негативная экспрессия p63, Cytokeratine 5/6. В случаях с плоскоклеточной карциномой — позитивная экспрессия p63, Cytokeratine 5/6 и негативная экспрессия Cytokeratine 7, TTF, Napsin A.

В паренхиматозном компоненте аденокарциномы выделяли структуры типа lepidic, ацинарные, папиллярные, микропапиллярные, солидные и одиночные опухолевые клетки. Паттерном lepidic называли структуры, представленные атипичными клетками кубической формы, выстилающими изнутри альвеолы. Ацинарным паттерном — округлые или овальные железы, образованные атипичными клетками. Папиллярным паттерном — сосочковые структуры с фиброваскулярной ножкой, выстланные

атипичными кубовидными или столбчатыми клетками. Микропапиллярным паттерном — мелкие сосочки с отсутствием фиброваскулярной ножки. Сольным паттерном — крупные поля и гнезда опухолевых клеток.

В паренхиматозном компоненте плоскоклеточной карциномы выделяли пять типов структур: 1) с ороговением; 2) состоящий из атипичных клеток шиповатого типа без ороговения; 3) состоящий из атипичных клеток базалоидного типа; 4) построенный из атипичных клеток с резко выраженным полиморфизмом; 5) одиночные опухолевые клетки [17]. Определяли наличие перечисленных структур и общее число структур в опухоли (рис. 1).

Оценивали степень дифференцировки опухоли (высокая, умеренная, низкая) и состояние стромы новообразования. Выраженность стромы в общем в опухоли и вокруг каждого из исследуемых вариантов

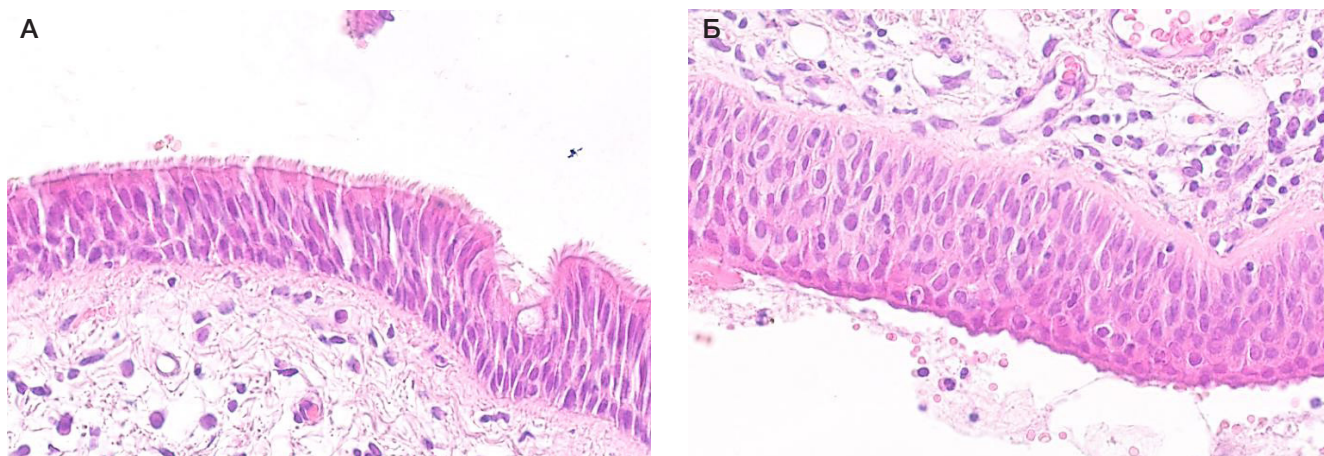


Рис. 2. Морфологические изменения бронхиального эпителия вне опухоли: базальноклеточная гиперплазия (А); плоскоклеточная метаплазия (Б) (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$)

структур паренхиматозного компонента новообразования определяли по трехбалльной системе (1 балл — слабо выражена, менее 30% от ткани опухоли; 2 балла — умеренно выражена, составляет 30–70% от ткани опухоли; 3 балла — выражена, составляет более 70% ткани опухоли). Выраженность воспалительной инфильтрации стромы в общем в опухоли и вблизи каждого из перечисленных типов структур паренхиматозного компонента оценивали в процентах по Salgado R. с соавт. [18]. Для исключения возможного субъективного фактора оценку описанных выше параметров проводили два независимых патоморфолога.

В слизистой оболочке бронхов, располагающихся на 3–4 см от границы опухоли, оценивали наличие базальноклеточной гиперплазии (БКГ) и плоскоклеточной метаплазии (ПМ) и их сочетания (рис. 2).

С учетом изменений, обнаруженных в бронхиальном эпителии, было сформировано три группы больных. Группу без базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ–ПМ–) составили 17 пациентов; группу с базальноклеточной гиперплазией, без плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ–) — 45 больных; группу с базальноклеточной гиперплазией и плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+) — 28 больных. В лимфатических узлах оценивали наличие метастатического поражения, подсчитывали количество лимфоузлов с метастазами. Срок наблюдения за больными составил 5 лет. Анализировали истории болезни и амбулаторные карты

больных. Учитывали информацию о наличии, сроках и локализации гематогенных метастазов и рецидивов.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием пакета программ Statistica 10.0 for Windows (Dell; США). Применяли методы описательной статистики, для оценки различий между двумя независимыми выборками использовали критерий Манна–Уитни. Поправку на множественность сравнений не использовали. Учитывали результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средний возраст больных не различался в исследуемых группах. Во всех группах немелкоклеточный рак легкого чаще имел центральную локализацию и его чаще обнаруживали у мужчин (табл. 1).

Достоверных различий в частоте встречаемости новообразований, соответствующих размерам T1, T2, T3, не было обнаружено ни в группе без базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии, ни в группе с изолированной базальноклеточной гиперплазией, ни в группе с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии.

Частота лимфогенного метастазирования в группе пациентов с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии была выше (57%) в сравнении

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика групп больных немелкоклеточным раком легкого с морфологическими изменениями бронхиального эпителия

Параметр		Исследуемые группы		
		БКГ–ПМ– (n = 17)	БКГ+ПМ– (n = 45)	БКГ+ПМ+ (n = 28)
		а	б	в
1	Возраст, М \pm SD	59,7 \pm 5,3	58,4 \pm 8,3	60,5 \pm 6,1
2	Пол, а. ч., %			
3	Мужчины	14/17 (82%) $p_4 = 0,0001$	36/45 (80%) $p_4 = 0,0000$	25/28 (89%) $p_4 = 0,0000$
4	Женщины	3/17 (18%)	9/45 (20%)	3/28 (11%)
5	Локализация, а.ч., %			
6	Центральный	14/17 (82%) $p_7 = 0,0001$	30/45 (67%) $p_7 = 0,0006$	23/28 (82%) $p_7 = 0,000$
7	Периферический	3/17 (18%)	15/45 (33%)	5/28 (18%)

Примечание: а. ч. — абсолютное число; p_4 — значение строки «3» (мужчины) по отношению к строке «4» (женщины); p_7 — значение строки «6» (центральный) по отношению к строке «7» (периферический).

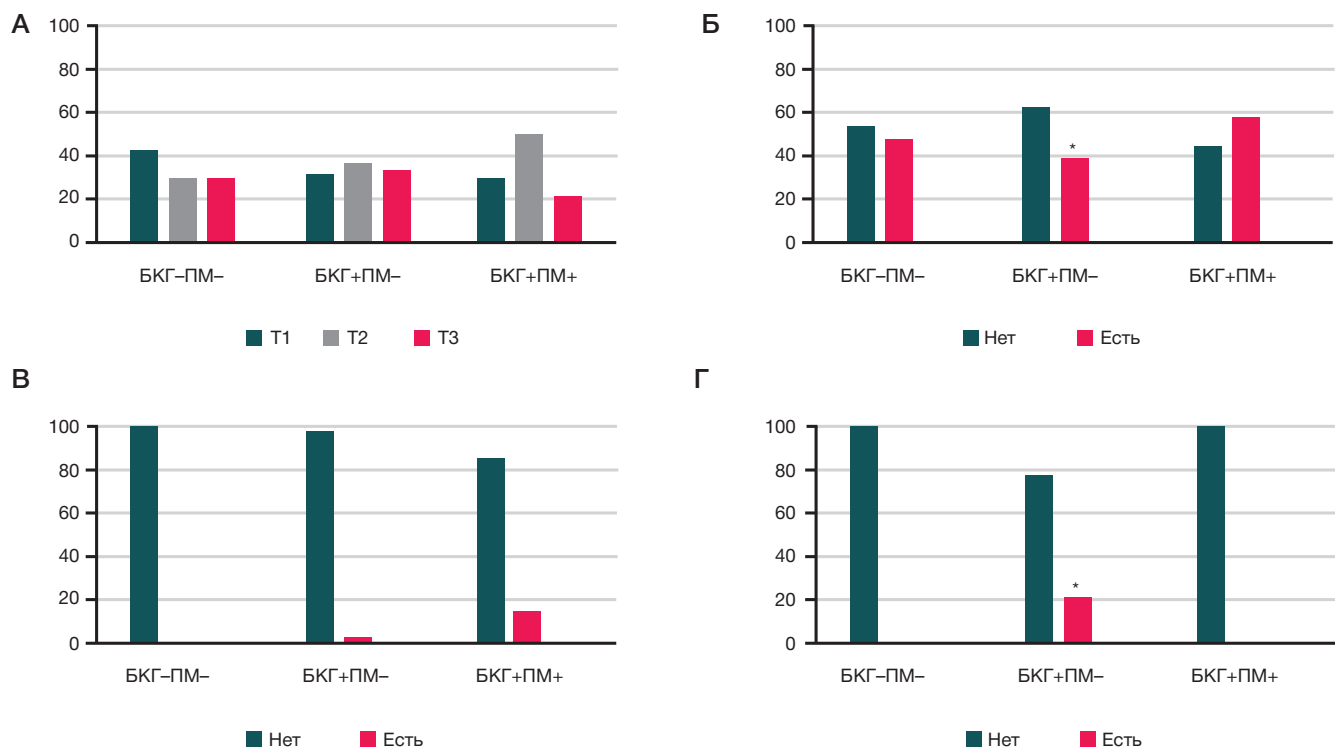


Рис. 3. Характеристика разных форм опухолевой прогрессии в группах больных НМРЛ с морфологическими изменениями бронхиального эпителия. **А.** Размер опухоли (Т). **Б.** Лимфогенные метастазы. **В.** Рецидивы. **Г.** Гематогенные метастазы

со случаями с изолированной базальноклеточной гиперплазией (38%; $p = 0,05$) и не отличалась от частоты в группе БКГ-ПМ- (47%).

Гематогенные метастазы чаще обнаруживались в группе больных с изолированной базальноклеточной гиперплазией (22%), в сравнении с группой БКГ-ПМ- (0%; $p = 0,019$) и в группе БКГ+ПМ+ (0%; $p = 0,004$).

Рецидивы обнаруживали в группе больных с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (14%) чаще, чем в группах пациентов БКГ-ПМ- (0%; $p = 0,05$) и БКГ+ПМ- (2%; $p = 0,02$) (рис. 3).

В группе пациентов без базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии гистотип опухоли соответствовал аденокарциноме чаще (65%), чем в случаях с плоскоклеточной карциномой (35%; $p = 0,04$). В случаях с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии чаще (64%) обнаруживали плоскоклеточную карциному, в сравнении со случаями с аденокарциномой (36%; $p = 0,01$). В группе пациентов с изолированной базальноклеточной гиперплазией частота встречаемости изучаемых гистотипов достоверно не различалась.

Степень дифференцировки аденокарциномы не различалась в исследуемых группах. В то же время ацинарные структуры в паренхиматозном компоненте аденокарциномы в группе больных с изолированной базальноклеточной гиперплазией обнаруживались реже (21%), чем в случаях с БКГ-ПМ- (91%; $p = 0,0005$) и БКГ+ПМ+ (90%; $p = 0,0007$). Папиллярные структуры, напротив, встречались в группе больных БКГ+ПМ- чаще (100%), чем в группах БКГ-ПМ- (18%; $p = 0,0000$) и БКГ+ПМ+ (20%; $p = 0,0000$). Одиночные клетки в паренхиматозном компоненте аденокарциномы в группе БКГ+ПМ+ обнаруживали реже (20%), чем в группах БКГ-ПМ- (64%; $p = 0,028$) и БКГ+ПМ- (58%; $p = 0,030$).

Степень дифференцировки плоскоклеточной карциномы не различалась в исследуемых группах. В то же время

изучение паренхиматозного компонента плоскоклеточной карциномы показало ряд различий в зависимости от морфологических изменений в бронхиальном эпителии. Так, II тип структур в паренхиматозном компоненте плоскоклеточной карциномы, представленный клетками шиповатого типа, чаще обнаруживали в группе с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (94%), чем в группах БКГ-ПМ- (67%; $p = 0,04$) и БКГ+ПМ- (69%; $p = 0,02$).

Частота встречаемости III типа структур в паренхиматозном компоненте плоскоклеточной карциномы, представленного клетками базалоидного типа, ниже в группе с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (22%), чем в группе БКГ+ПМ- (50%; $p = 0,025$), и не отличалась от данного показателя в группе БКГ-ПМ- (50%).

Достоверных различий в количестве сочетающихся типов структур в паренхиматозном компоненте новообразования, в выраженности стромы и воспалительной инфильтрации стромы в исследуемых группах больных не было обнаружено ни при аденокарциноме, ни при плоскоклеточной карциноме легкого (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование позволило выявить ряд закономерностей, характеризующих немелкоклеточную карциному легких у пациентов с различными морфологическими изменениями бронхиального эпителия.

Обратила на себя внимание группа пациентов с изолированной базальноклеточной гиперплазией в бронхиальном эпителии, в которой чаще обнаруживались гематогенные метастазы при более редком лимфогенном метастазировании. В этой группе частота возникновения разных гистотипов была достоверно не различимой. В случаях возникновения аденокарциномы в паренхиматозном компоненте новообразования чаще обнаруживались

Таблица 2. Гистологическая характеристика первичной опухоли в группах больных немелкоклеточным раком легкого с морфологическими изменениями бронхиального эпителия

Параметр		Исследуемые группы		
		БКГ–ПМ– (n = 17)	БКГ+ПМ– (n = 45)	БКГ+ПМ+ (n = 28)
		а	б	в
1	Гистологический тип, а.ч., %			
2	Аденокарцинома	11/17 (65%) $p_3 = 0,04$	19/45 (42%)	10/28 (36%) $p_3 = 0,01$
3	Плоскоклеточная карцинома	6/17 (35%)	26/45 (58%)	18/28 (64%)
4	Степень дифференцировки аденокарциномы, а.ч., %			
5	Высокая	3/11 (27%)	7/19 (37%)	2/10 (20%)
6	Умеренная	5/11 (46%)	7/19 (37%)	5/10 (50%)
7	Низкая	3/11 (27%)	5/19 (26%)	3/10 (30%)
8	Типы структур аденокарциномы, а.ч., %			
9	lepidic	2/11 (18%)	7/19 (37%)	2/10 (20%)
10	Ацинарные	10/11 (91%)	4/19 (21%) $p_a = 0,0005$ $p_b = 0,0005$	9/10 (90%)
11	Папиллярные	2/11 (18%)	19/19 (100%)	2/10 (20%)
12	Микропапиллярные	3/11 (27%)	7/19 (37%)	1/10 (10%)
13	Солитные	6/11 (54%)	6/19 (32%)	5/10 (50%)
14	Одиночные клетки	7/11 (64%)	11/19 (58%)	2/10 (20%)
15	Число сочетающихся типов структур аденокарциномы, Me ($Q_1 \div Q_3$)	3,0 (2,0÷3,0) (n = 11)	3,0 (2,0÷4,0) (n = 19)	2,0 (1,0÷3,0) (n = 10)
16	Общая выраженность стромы аденокарциномы, Me ($Q_1 \div Q_3$)	1,0 (1,0÷2,0) (n = 11)	1,0 (1,0÷2,0) (n = 19)	2,0 (1,0÷2,0) (n = 10)
17	Общая выраженность воспалительной инфильтрации стромы аденокарциномы в %, Me ($Q_1 \div Q_3$)	20,0 (10,0÷90,0) (n = 11)	20,0 (10,0÷60,0) (n = 19)	15,0 (10,0÷60,0) (n = 10)
18	Степень дифференцировки плоскоклеточной карциномы, а.ч., %			
19	Высокая	0/6 (0%)	2/26 (8%)	0/18 (0%)
20	Умеренная	4/6 (67%)	17/26 (65%)	12/18 (67%)
21	Низкая	2/6 (33%)	7/26 (27%)	6/18 (33%)
	Типы структур плоскоклеточной карциномы, а.ч., %			
22	I тип (ороговение)	0/6 (0%)	6/26 (23%)	2/18 (11%)
23	II тип (шиповатый)	4/6 (67%)	18/26 (69%)	17/18 (94%) $p_a = 0,04$ $p_b = 0,02$
24	III тип (базалоидный)	3/6 (50%)	13/26 (50%) $p_a = 0,025$	4/18 (22%)
25	IV тип (полиморфные)	2/6 (33%)	14/26 (54%)	11/18 (61%)
26	Одиночные клетки	3/6 (50%)	17/26 (65%)	9/18 (50%)
27	Количество сочетающихся типов структур плоскоклеточной карциномы, Me ($Q_1 \div Q_3$)	2,0 (1,0÷3,0) (n = 6)	3,0 (1,0÷4,0) (n = 26)	2,5 (1,0÷3,0) (n = 18)
28	Общая выраженность стромы плоскоклеточной карциномы, Me ($Q_1 \div Q_3$)	1,5 (1,0÷2,0) (n = 6)	2,0 (1,0÷2,0) (n = 26)	1,0 (1,0÷2,0) (n = 18)
29	Общая выраженность воспалительной инфильтрации стромы плоскоклеточной карциномы в %, Me ($Q_1 \div Q_3$)	40,0 (20,0÷70,0) (n = 6)	20,0 (10,0÷70,0) (n = 26)	20,0 (5,0÷70,0) (n = 18)

Примечание: p_3 — значение строки «3» (плоскоклеточная карцинома) по отношению к строке «2» (аденокарцинома); p_a — значение столбца «б» (БКГ+ПМ–) по отношению к столбцу «а» (БКГ–ПМ–); p_b — значение столбца «б» (БКГ+ПМ–) по отношению к столбцу «в» (БКГ+ПМ+).

менее дифференцированные папиллярные и, реже, более дифференцированные ацинарные структуры.

Для группы больных с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии в респираторном эпителии была характерна большая частота лимфогенного метастазирования и рецидивирования при отсутствии гематогенного метастазирования. В этой группе новообразование в основном было представлено

плоскоклеточной карциномой, в паренхиматозном компоненте которой чаще обнаруживали структуры II типа (шиповатые) — более дифференцированные, и реже III типа (базалоидные) — менее дифференцированные.

У пациентов без базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии чаще диагностировали аденокарциному. Характерных особенностей в частоте лимфогенного, гематогенного метастазирования,

рецидивирования, морфологического разнообразия паренхиматозного компонента опухоли для этой группы не обнаружено.

В группе с БКГ+ПМ+ лимфогенные метастазы встречались чаще, чем в группе с БКГ+ПМ-. Показано, что рецидивы немелкоклеточного рака легких в большинстве случаев представляют собой метастазы лимфогенные метастазы [14]. Результаты обсуждаемой работы позволяют предположить, что имеются общие звенья механизмов синхронного и метастазного лимфогенного метастазирования.

Полученные результаты подтверждают ранее обнаруженные данные о высоком риске гематогенного метастазирования в группе с БКГ+ПМ-, рецидивирования в группе с БКГ+ПМ+. Обнаружено, что эти группы различаются не только риском развития разных форм прогрессирования, но и морфологическим строением первичной опухоли. Интересно, что в группе с БКГ+ПМ+ чаще встречается плоскоклеточная карцинома. Не исключено, что склонность к плоскоклеточной метаплазии в условиях хронического воспаления является одной из предпосылок в развитии плоскоклеточной карциномы, поскольку именно в метапластическом плоском эпителии может развиваться предраковый процесс дисплазия, и в дальнейшем — карцинома. Представляются еще более важными впервые обнаруженные различия морфологического строения первичных опухолей. В группе с высоким риском гематогенного метастазирования (БКГ+ПМ-) и в аденокарциномах, и в плоскоклеточных карциномах чаще встречаются низкодифференцированные структуры опухоли. Ранее было высказано предположение, что группы с разным характером изменений в мелких

bronхах отражают сущностные конститутивные различия стромально-паренхиматозных отношений, которые сопряжены с паренхиматозно-стромальными отношениями в карциномах [13, 14].

В основе различий состояния стромы в сравниваемых группах лежат особенности иммуно-воспалительных реакций. Результаты исследования позволяют дополнить гипотезу предположением, что вариант иммуно-воспалительной реакции в микроокружении немелкоклеточного рака легких с БКГ+ПМ- способствует не только гематогенному метастазированию, но и дедифференцировке опухолевых элементов. Последнее может быть самостоятельным кофактором, способствующим гематогенному метастазированию. Расшифровка механизмов описанного феномена является предметом дальнейшей исследовательской работы.

ВЫВОДЫ

Результаты работы не только подтвердили ассоциацию варианта изменений эпителия мелких бронхов, смежных с опухолью, с разной степенью риска метастазирования и рецидивирования, но и показали связь со степенью дифференцировки опухолевых элементов. В основе этих закономерностей могут лежать конститутивные особенности стромально-паренхиматозных отношений, проявляющиеся, как в условиях хронического воспаления в бронхах, так и при развитии опухоли. Более детальное изучение гистохимических и молекулярно-генетических механизмов, принимающих участие в формировании этих взаимосвязей, является целью дальнейших исследований.

Литература

- Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В., редакторы. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 г. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018.
- Панкова О. В., Перельмутер В. М., Литвяков Н. В., Денисов Е. В., Гердт Л. В. Взаимосвязь неопластических изменений с базальноклеточной гиперплазией бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого. Сибирский онкологический журнал. 2011; 5: 57–60.
- Панкова О. В., Перельмутер В. М., Тузиков С. А., Денисов Е. В. Пре- и неопластические изменения бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого. Бюллетень сибирской медицины. 2014; 13 (3): 100–10.
- Панкова О. В., Перельмутер В. М., Савенкова О. В., Денисов Е. В., Васильев С. А., Скрябин Н. А., и др. Особенности воспалительной реакции в слизистой бронха в участках базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии на фоне плоскоклеточного рака легкого. Сибирский онкологический журнал. 2012; 5: 28–33.
- Панкова О. В., Перельмутер В. М., Савенкова О. В. Характеристика экспрессии маркеров пролиферации и регуляции апоптоза в зависимости от характера дисрегенераторных изменений в эпителии бронхов при плоскоклеточном раке легкого. Сибирский онкологический журнал. 2010; 5: 36–41.
- Kerr KM. Preneoplastic and Preinvasive Lesions. Diagnostic Pulmonary Pathology. In: Cagle PT, Allen TC, Beasley MB editors. 2008; 519–26.
- Kerr KM, Popper HH. Pre-invasive lung lesions. European Respiratory Monograph. 2007; 12 (39): 37–63.
- Dacic S. Pulmonary Preneoplasia. Archives of pathology & laboratory medicine. 2008; 132 (7): 1073–8.
- Greenberg A, Yee H, Rom W. Preneoplastic lesions of the lung. Respiratory research. 2002; 3 (1): 1–10.
- Lantuejoul S, Salameire D, Salon C, Brambilla E. Pulmonary preneoplasia — sequential molecular carcinogenetic events. Histopathology. 2009; 54 (1): 43–54.
- Denisov EV, Schegoleva AA, Gervas PA, Ponomaryova AA, Tashireva LA, Boyarko VV, et al. Premalignant lesions of squamous cell carcinoma of the lung: The molecular make-up and factors affecting their progression. Lung Cancer. 2019; 135: 21–28.
- Pankova OV, Denisov EV, Ponomaryova AA, Gerashchenko TS, Tuzikov SA, Perelmutter VM. Recurrence of squamous cell lung carcinoma is associated with the co-presence of reactive lesions in tumor-adjacent bronchial epithelium. Tumor Biology. 2016; 37 (3): 3599–607.
- Pankova OV, Tashireva LA, Rodionov EO, Miller SV, Tuzikov SA, Pismenny DS, et al. Premalignant changes in the bronchial epithelium are prognostic factors of distant metastasis in non-small cell lung cancer patients. Frontiers in Oncology. 2021; 11: 771802. DOI: 10.3389/fonc.2021.771802.
- Pankova OV, Rodionov EO, Miller SV, Tuzikov SA, Tashireva LA, Gerashchenko TS, et al. Neoadjuvant chemotherapy combined with intraoperative radiotherapy is effective to prevent recurrence in high-risk non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Translational Lung Cancer Research. 2020; 9 (4): 988–99. DOI: 10.21037/tlcr-19-719.
- Hortobagyi GN, Connolly JL, D'Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Hugo HS. The AJCC Cancer staging manual. Eight Edition: Springer Nature. 2017.
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart.

International Agency for Research on Cancer. Journal of Thoracic Oncology. 2015; 10 (9): 1243–60.

17. Савенкова О. В., Завьялова М. В., Бычков В. А., Чойнзонов Е. Л., Перельмутер В. М. Связь экспрессии матричных металлопротеиназ с морфологической гетерогенностью, дифференцировкой опухоли и лимфогенным метастазированием

плоскоклеточной карциномы гортани. Сибирский онкологический журнал. 2015; 1: 51–58.

18. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. Annals of oncology. 2015; 26 (2): 259–71.

References

1. Kaprin AD, Starinskij VV, Petrova GV, redaktory. Sostoyanie onkologicheskoy pomoshhi naseleniyu Rossii v 2017 g. M.: MNIOI im. PA Gercena — filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii, 2018. Russian.
2. Pankova OV, Perelmutter VM, Litvyakov NV, Denisov EV, Gerdt LV. Vzaimosvyaz' neoplasticheskix izmenenij s bazal'nokletочноj giperplaziej bronxial'nogo ehpiteliya pri ploskokletочноm rake i adenokarcinome legkogo. Sibirskij onkologicheskij zhurnal. 2011; 5: 57–60. Russian.
3. Pankova OV, Perelmutter VM, Tuzikov SA, Denisov EV. Pre- i neoplasticheskie izmeneniya bronxial'nogo ehpiteliya pri ploskokletочноm rake i adenokarcinome legkogo. Byulleten' sibirskoj mediciny. 2014; 13 (3): 100–10. Russian.
4. Pankova OV, Perelmutter VM, Savenkova OV, Denisov EV, Vasilev SA, Skryabin NA, i dr. Osobennosti vospalitel'noj reakcii v slizistoj bronxa v uchastkax bazal'nokletочноj giperplazii i ploskokletочноj metaplazii na fone ploskokletочноgo raka legkogo. Sibirskij onkologicheskij zhurnal. 2012; 5: 28–33. Russian.
5. Pankova OV, Perelmutter VM, Savenkova OV. Charakteristika ehkspressii markerov proliferacii i reguljacii apoptoza v zavisimosti ot xaraktera disregeneratornyx izmenenij v ehpitelii bronxov pri ploskokletочноm rake legkogo. Sibirskij onkologicheskij zhurnal. 2010; 5: 36–41. Russian.
6. Kerr KM. Preneoplastic and Preinvasive Lesions. Diagnostic Pulmonary Pathology. In: Cagle PT, Allen TC, Beasley MB editors. 2008; 519–26.
7. Kerr KM, Popper HH. Pre-invasive lung lesions. European Respiratory Monograph. 2007; 12 (39): 37–63.
8. Dacic S. Pulmonary Preneoplasia. Archives of pathology & laboratory medicine. 2008; 132 (7): 1073–8.
9. Greenberg A, Yee H, Rom W. Preneoplastic lesions of the lung. Respiratory research. 2002; 3 (1): 1–10.
10. Lantuejoul S, Salameire D, Salou C, Brambilla E. Pulmonary preneoplasia — sequential molecular carcinogenetic events. Histopathology. 2009; 54 (1): 43–54.
11. Denisov EV, Schegoleva AA, Gervas PA, Ponomaryova AA, Tashireva LA, Boyarko VV, et al. Premalignant lesions of squamous cell carcinoma of the lung: The molecular make-up and factors affecting their progression. Lung Cancer. 2019; 135: 21–28.
12. Pankova OV, Denisov EV, Ponomaryova AA, Gerashchenko TS, Tuzikov SA, Perelmutter VM. Recurrence of squamous cell lung carcinoma is associated with the co-presence of reactive lesions in tumor-adjacent bronchial epithelium. Tumor Biology. 2016; 37 (3): 3599–607.
13. Pankova OV, Tashireva LA, Rodionov EO, Miller SV, Tuzikov SA, Pismenny DS, et al. Premalignant changes in the bronchial epithelium are prognostic factors of distant metastasis in non-small cell lung cancer patients. Frontiers in Oncology. 2021; 11: 771802. DOI: 10.3389/fonc.2021.771802.
14. Pankova OV, Rodionov EO, Miller SV, Tuzikov SA, Tashireva LA, Gerashchenko TS, et al. Neoadjuvant chemotherapy combined with intraoperative radiotherapy is effective to prevent recurrence in high-risk non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Translational Lung Cancer Research. 2020; 9 (4): 988–99. DOI: 10.21037/tlcr-19-719.
15. Hortobagyi GN, Connolly JL, D'Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Hugo HS. The AJCC Cancer staging manual. Eight Edition: Springer Nature. 2017.
16. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. International Agency for Research on Cancer. Journal of Thoracic Oncology. 2015; 10 (9): 1243–60.
17. Savenkova OV, Zavyalova MV, Bychkov VA, Choinzonov EL, Perelmutter VM. Svyaz' ehkspressii matriksnyx metalloproteinaz s morfologicheskoy geterogennost'yu, differencirovkoj opuxoli i limfogennym metastazirovaniem ploskokletочноj karcinomy gortani. Sibirskij onkologicheskij zhurnal. 2015; 1: 51–58. Russian.
18. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. Annals of oncology. 2015; 26 (2): 259–71.

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ВАРИАТИВНОСТИ ПОТЕНЦИАЛОВ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В ИНТЕРФЕЙСЕ МОЗГ–КОМПЬЮТЕР НА ВОЛНЕ P300

И. П. Ганин , А. Я. Каплан

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия


Технология интерфейсов мозг–компьютер на волне P300 (ИМК–P300) позволяет пользователю выбирать команды при фокусировании на них внимания. Это возможно за счет регистрации в ЭЭГ потенциалов, связанных с событиями (ПСС), возникающих в ответ на многократно повторяемые внешние стимулы. Традиционно при выделении и анализе ПСС полагают, что реакции на отдельные стимулы идентичны, хотя в нейрофизиологии известен феномен вариативности во времени возникновения таких реакций. Поэтому есть предпосылки считать, что непринятие во внимание вариативности ПСС в ряде случаев может снижать наблюдаемые в эксперименте эффекты, а также точность работы ИМК. Целью работы было изучить эффекты вариативности ЭЭГ-реакций внимания пользователя к стимульным командам в ИМК–P300 и выявить возможности учета этих эффектов при классификации команд в интерфейсе. Здоровым испытуемым 21–22 лет ($n = 12$) необходимо было реагировать на целевые стимулы в модифицированной нами стимульной матрице ИМК–P300, которая могла двигаться с различными параметрами в пределах рабочего поля. В исследовании показано, что эффект вариативности ПСС присутствует в технологии ИМК–P300, а использованный метод коррекции латентности пиков в единичных реакциях привел к увеличению амплитуды компонентов ПСС в 1,5–2 раза, а также повышению точности классификации с 71–78% до 92–95% ($p < 0,0005$). Вариативность и повышение классификации после коррекции латентности были выше в более требовательном по ресурсам внимания режиме с наибольшей скоростью движения стимульной матрицы. В целом результаты показывают важность учета вариативности компонентов ПСС в ИМК–P300 для создания более эффективных систем нейроуправления.

Ключевые слова: интерфейс мозг–компьютер, электроэнцефалограмма, потенциалы, связанные с событиями, компонент P300, компонент N1, вариативность ПСС

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-75-00021, <https://rscf.ru/project/21-75-00021/>

Вклад авторов: И. П. Ганин — проведение исследования, анализ и интерпретация данных, анализ литературы, подготовка текста рукописи; А. Я. Каплан — интерпретация данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом МГУ имени М. В. Ломоносова (протокол № 2 от 11 октября 2010 г.); проведено с использованием ЭЭГ-данных (http://brain.bio.msu.ru/eeg_mov_matrix_BCI.htm), полученных авторами и опубликованных ранее (<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.03.089>).

 **Для корреспонденции:** Илья Петрович Ганин
Ленинские горы, д. 1, стр. 12, к. 246, Москва, 119234, Россия; ipganin@mail.ru

Статья получена: 04.05.2022 **Статья принята к печати:** 29.05.2022 **Опубликована онлайн:** 21.06.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.033

STUDY OF THE HUMAN BRAIN POTENTIALS VARIABILITY EFFECTS IN P300 BASED BRAIN–COMPUTER INTERFACE

Ganin IP , Kaplan AYa

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The P300-based brain–computer interfaces (P300 BCI) allow the user to select commands by focusing on them. The technology involves electroencephalographic (EEG) representation of the event-related potentials (ERP) that arise in response to repetitive external stimulation. Conventional procedures for ERP extraction and analysis imply that identical stimuli produce identical responses. However, the floating onset of EEG reactions is a known neurophysiological phenomenon. A failure to account for this source of variability may considerably skew the output and undermine the overall accuracy of the interface. This study aimed to analyze the effects of ERP variability in EEG reactions in order to minimize their influence on P300 BCI command classification accuracy. Healthy subjects aged 21–22 years ($n = 12$) were presented with a modified P300 BCI matrix moving with specified parameters within the working area. The results strongly support the inherent significance of ERP variability in P300 BCI environments. The correction of peak latencies in single EEG reactions provided a 1.5–2 fold increase in ERP amplitude with a concomitant enhancement of classification accuracy (from 71–78% to 92–95%, $p < 0.0005$). These effects were particularly pronounced in attention-demanding tasks with the highest matrix velocities. The findings underscore the importance of accounting for ERP variability in advanced BCI systems.

Keywords: brain–computer interface (BCI), electroencephalography (EEG), event-related potentials (ERP), P300 component, N1 component, temporal variability of ERP

Funding: the study was funded by the Russian Science Foundation, project number 21-75-00021, <https://rscf.ru/project/21-75-00021/>

Author contribution: Ganin IP — research, data analysis and interpretation, literature analysis, preparation of the text; Kaplan AYa — data interpretation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review Board at the Lomonosov Moscow State University (protocol number 2 of 11 October 2010) and carried out using EEG data (http://brain.bio.msu.ru/eeg_mov_matrix_BCI.htm) obtained by the authors and published earlier (<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.03.089>).

 **Correspondence should be addressed:** Ilya P. Ganin
Leninskie Gory, 1, str. 12, k. 246, Moscow, 119234, Russia; ipganin@mail.ru

Received: 04.05.2022 **Accepted:** 29.05.2022 **Published online:** 21.06.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.033

Технология интерфейсов мозг–компьютер (ИМК) предоставляет пользователю возможность управления исполнительными устройствами без посредства периферических нервов и мышц, за счет регистрации и преобразования электрической активности мозга,

чаще всего методом электроэнцефалографии (ЭЭГ) [1]. Традиционно практическая область применения этой технологии обусловлена разработкой систем нейрореабилитации и частичного замещения речевых и моторных функций для пациентов с тяжелыми

двигательными нарушениями [2]. Кроме того, технология ИМК может находить свое применение как вспомогательное средство инструментальной диагностики, например, при аутизме [3] или при нервной анорексии [4], а также в системах тренировки когнитивных функций [5].

Наиболее эффективны для коммуникации и управления ИМК, основанные на предъявлении пользователю внешних стимулов и детектировании в ЭЭГ потенциалов, связанных с событиями (ПСС), отражающих реакцию внимания к этим стимулам [6]. Впервые подобная технология ИМК для набора текста была опубликована в 1988 г. [7] и получила название «ИМК-Р300». Пользователь видит перед собой буквенную матрицу, стимулами в которой служат поочередные подсветки букв. При мысленном реагировании на подсветки целевых букв в составе ПСС увеличивается ряд компонентов, и в первую очередь волна Р300. В результате анализа ПСС алгоритм ИМК может с высокой вероятностью определить целевой стимул, на котором сфокусировано внимание пользователя [8].

Общий принцип классификации (разделения реакций на целевые и нецелевые классы) в ИМК основан на базовом методе получения и анализа ПСС. Согласно ему, для получения ПСС из ЭЭГ выделяют отдельные эпохи в ответ на повторяющиеся стимулы, а при усреднении этих идентичных эпох происходит выделение когерентного стимулу сигнала ПСС среди общего шума, который не является когерентным по отношению к моментам стимуляции [6].

Тем не менее в нейрофизиологии известен феномен вариативности латентности единичных ЭЭГ-реакций относительно моментов предъявления внешних стимулов [9]. Такая вариативность ответов в отдельных попытках при усреднении их синхронно с моментами предъявления стимула может приводить к искажению в оценке компонентов ПСС [10]. Причем вариативность могут проявлять как более ранние, так и более поздние компоненты [11, 12]. Так, было показано [13], что усредненная волна Р300 оценивается необъективно из-за вариативности латентности между отдельными попытками, из-за чего амплитуда пика уменьшается, а его ширина увеличивается [14]. Поэтому весьма вероятным представляется влияние вариативности не только на изучаемые в том или ином исследовании эффекты, но и на точность классификации в ИМК-Р300.

В целом известно, что латентность компонентов ПСС, в частности Р300, коррелирует с возрастом, когнитивными особенностями человека и другими факторами [15, 16]. Отклонения в характеристиках единичных ответов на внешние стимулы можно наблюдать в случае, когда внимание субъекта распределяется между двумя задачами, причем вариативность увеличивается пропорционально сложности второго конкурирующего за перцептивные ресурсы задания [16]. Процесс достижения конечной цели с помощью ИМК (набор текста) и выполнение непосредственных инструкций (реагирование на стимулы) сами по себе могут быть конкурирующими задачами. Кроме того, использование технологии ИМК в реальных условиях может сопровождаться наличием сопутствующих задач, вызывающих постоянные вариации внимания и восприятия [17]. Важно отметить также, что дополнительным источником разнонаправленных эффектов на характеристики ПСС, в том числе вариативности, могут служить особенности параметров стимуляции: темп предъявления стимулов в ИМК обычно составляет до 4–5 в 1 с [8], в то время как стандартные

рекомендации для получения и анализа ПСС предполагают предъявление одного стимула в 1–2 с [18].

С точки зрения нейрофизиологии процессы вариативности в мозге имеют различные причины на разных уровнях организации нервной системы и в целом их считают естественным явлением для мозга [19]. Однако высокий уровень общей вариативности может быть связан с рядом патологических состояний, поскольку может отражать повышенный уровень нейронального шума и пластичности, затрудняя оценку индивидом внешних событий и формирование адекватной реакции на них, например, при аутизме [19, 20]. Повышенная вариативность ПСС также была выявлена у пациентов с синдромом дефицита внимания и гиперактивности, особенно в заданиях, требующих повышенной когнитивной нагрузки [19, 21].

Поскольку процесс когнитивного утомления субъекта рассматривают как одну из возможных причин вариативности реакций ЭЭГ [22], данный фактор может негативно влиять на результативность управления в ИМК-Р300 как для здоровых пользователей, так и в большей степени для пациентов. У людей с нарушениями двигательных и речевых функций показано снижение внимания и иногда некоторых когнитивных функций, и в целом такие пользователи быстрее начинают испытывать утомление и затруднения при длительном управлении в ИМК [23, 24].

В связи с этим крайне важным представляется выявление эффектов вариативности ПСС в ИМК-Р300, причем в различных по вовлечению ресурсов внимания условиях. С одной стороны, знание этих закономерностей позволит создавать оптимальную по эффективности стимульную среду, с другой — максимально компенсировать эффекты вариативности, что облегчит освоение этой технологии как здоровыми пользователями, так и особенно пациентами. Целью исследования было определить эффекты вариативности ЭЭГ-реакций внимания пользователя к стимульным командам в ИМК-Р300 и выявить возможности учета этих эффектов при классификации стимулов-команд в ИМК.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали ЭЭГ-данные, полученные ранее в модифицированной версии ИМК-Р300 со стимульной матрицей, которая могла свободно перемещаться в пределах зрительного поля. Детали этой модификации и часть полученных при ее использовании результатов были описаны нами ранее [25]. Настоящее исследование посвящено выявлению и оценке эффектов вариативности ПСС, возникающих у пользователя такого интерфейса.

В исходном исследовании, проводившемся на биологическом факультете МГУ имени М. В. Ломоносова, принимало участие 12 испытуемых (четверо мужчин и восемь женщин) в возрасте 21–22 года. Критерии включения: здоровые добровольцы мужского и женского пола в возрасте 18–35 лет. Критерии исключения: наличие диагностированных неврологических и/или психических заболеваний, наличие эпизодов судорожных припадков или диагностированного эпилептического статуса. Изначально исследование было спланировано для проверки гипотезы о возможности детектирования на основе ПСС фокуса внимания к целевым стимулам, если их позиции будут постоянно находиться в движении [25].

Матрица размером 3×3 , состоящая из иконок, имела угловые размер $7,4^\circ \times 7,4^\circ$, размер отдельного стимула — $2,2^\circ \times 2,2^\circ$. Стимуляцию осуществляли в виде подсветок (125 мс через каждые 500 мс) строк и столбцов матрицы в случайном порядке.

Заданием испытуемого было сфокусировать внимание на целевом стимуле матрицы, внимательно следить за данным стимулом и мысленно считать число подсветок, приходящихся на него.

В исследовании использовали различные типы и скорости движения матрицы в пределах экрана. Движение было прямолинейным с постоянной скоростью, направление инвертировалось при достижении края экрана. Всего было шесть режимов:

- «статичная матрица» (располагалась неподвижно в центре);
- «горизонтальное движение» (со скоростью $5^\circ/\text{с}$);
- «вертикальное движение» (со скоростью $5^\circ/\text{с}$);
- «хаотичное движение» (со скоростью $5^\circ/\text{с}$, направление могло меняться в случайные моменты времени);
- «скорость $10^\circ/\text{с}$ » (горизонтальное движение);
- «скорость $20^\circ/\text{с}$ » (горизонтальное движение).

Все режимы для каждого испытуемого чередовали в случайном порядке. В одном режиме предъявляли 120 целевых и 240 нецелевых стимулов.

ЭЭГ регистрировали с помощью шести электродов: Cz, Pz, PO7, PO8, O1, O2 с объединенным референтным электродом на мочках ушей (электроэнцефалограф NVX24, «МКС»; Зеленоград, Россия). Частота дискретизации сигнала — 250 Гц. Запись осуществляли в программе CONAN-NVX, предъявление стимулов — с помощью оригинального программного обеспечения, написанного на языке программирования Python 2.6. Для синхронизации ЭЭГ с моментом начала подсветок использовали датчик на основе фотодиода. Одновременно с появлением целевого/нецелевого стимула в правом верхнем углу экрана ровно под датчиком появлялся небольшой белый/черный квадрат. Сигнал от датчика записывался вместе с ЭЭГ-данными в отдельный канал, и по изменению яркости под датчиком можно было точно определять реальные моменты появления стимулов.

Работу с сигналом ЭЭГ, выделение и обработку ПСС осуществляли в среде MATLAB 9.11 (R2021b) (MathWorks; США). Сигнал ЭЭГ подвергали полосной фильтрации в диапазоне 0,5–20 Гц (или 0,5–10 Гц для работы с индивидуальными эпохами и расчета классификации) фильтром Баттерворта 4-го порядка, а затем разбивали на эпохи с границами от –400 до 1200 мс относительно стимула. Исключали артефактные эпохи, содержащие превышение амплитуды сигнала в любом из каналов ± 50 мкВ. Число исключенных эпох обычно не превышало 10%.

Эпохи ЭЭГ разделяли на целевые и нецелевые, после чего усредняли внутри каждого испытуемого и режима, формируя целевые и нецелевые ПСС с укорочением окна от –200 до 800 мс. В канале Pz определялась амплитуда компонента P300 как максимальное значение сигнала в окне от 300 до 600 мс после стимула, а в каналах PO7, PO8, O1, O2 — амплитуда компонента N1 как минимальное значение сигнала в окне от 100 до 300 мс. Латентности пиков определяли как время максимума или минимума относительно начала стимула.

Для анализа вариативности компонентов ПСС латентности пиков P300 и N1 рассчитывали аналогично в тех же каналах и окнах, но в единичных неусредненных

эпохах. На основе значений латентностей все эпохи (внутри каждого канала, режима и испытуемого) сортировали от меньшего значения к большему. Для анализа вариативности латентностей пиков ПСС рассчитывали медианное абсолютное отклонение (median absolute deviation, MAD) в каждом режиме у каждого испытуемого. Для анализа влияния вариативности компонентов на ПСС все эпохи перед усреднением центрировали по времени пика: определяли разницу между латентностью в усредненном ПСС и латентностью индивидуальной эпохи, затем каждая эпоха сдвигалась по оси времени на данную величину (вперед или назад), после чего их все они усредняли обычным способом с окном от –200 до 800 мс. Эпохи в каналах Cz и Pz корректировали по времени пика P300, а в затылочных каналах — по времени пика N1. В усредненных скорректированных ПСС также рассчитывали амплитуды пиков. Для группового анализа амплитуд N1 использовали значения, вычисленные в усредненной по четырем каналам (PO7, PO8, O1, O2) кривой.

Для оценки вариативности компонентов ПСС внутри одного испытуемого амплитуды рассчитывали в индивидуальных эпохах ЭЭГ (исходных и скорректированных по латентности): в каждой эпохе вычисляли среднее значение сигнала в окне шириной 52 мс, центрированном по латентности пика в конкретном канале и режиме.

Для выявления эффектов вариативности ПСС на возможность детектирования команд в ИМК-P300 рассчитывали показатели оффлайн-классификации у всех испытуемых в каждом режиме, отдельно для исходного варианта усреднения ПСС и для скорректированных по латентности эпох. Вектор признаков для линейного дискриминанта Фишера в каждом режиме формировали на основе значения амплитуд сигнала во всех каналах ЭЭГ в окне 600 мс после стимула (брали одну точку на каждые 50 мс). Точность классификации оценивали методом кросс-валидации (leave-one-out) при последовательном тестировании каждой эпохи с классификатором, обученном на всех остальных эпохах того же режима. Процедуру повторяли для всех эпох, а точность классификации оценивали как процент правильно определенных эпох (два класса: целевые и нецелевые). Для корректного расчета точности перед классификацией количество целевых и нецелевых эпох выравнивали путем случайного удаления части нецелевых эпох. Для исключения вариаций результатов такой процесс классификации повторяли 100 раз со случайным удалением нецелевых эпох в каждой итерации, после чего брали среднее значение точности по 100 итерациям.

По всем вычисленным значениям амплитуд, латентностей, точности классификации проводили статистический анализ данных (пакет STATISTICA 7.0). Для группового анализа применяли однофакторный или двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA). При наличии значимых главных эффектов для парных сравнений применяли апостериорный (post hoc) критерий Тьюки или Бенджамини-Хохберга. При анализе амплитуд компонентов внутри отдельного испытуемого после проверки распределения на нормальность (χ^2 , критерий Хи-квадрат) применяли парный t -критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для визуализации процесса работы с единичными эпохами ЭЭГ (до усреднения ПСС) по горизонтали откладывали

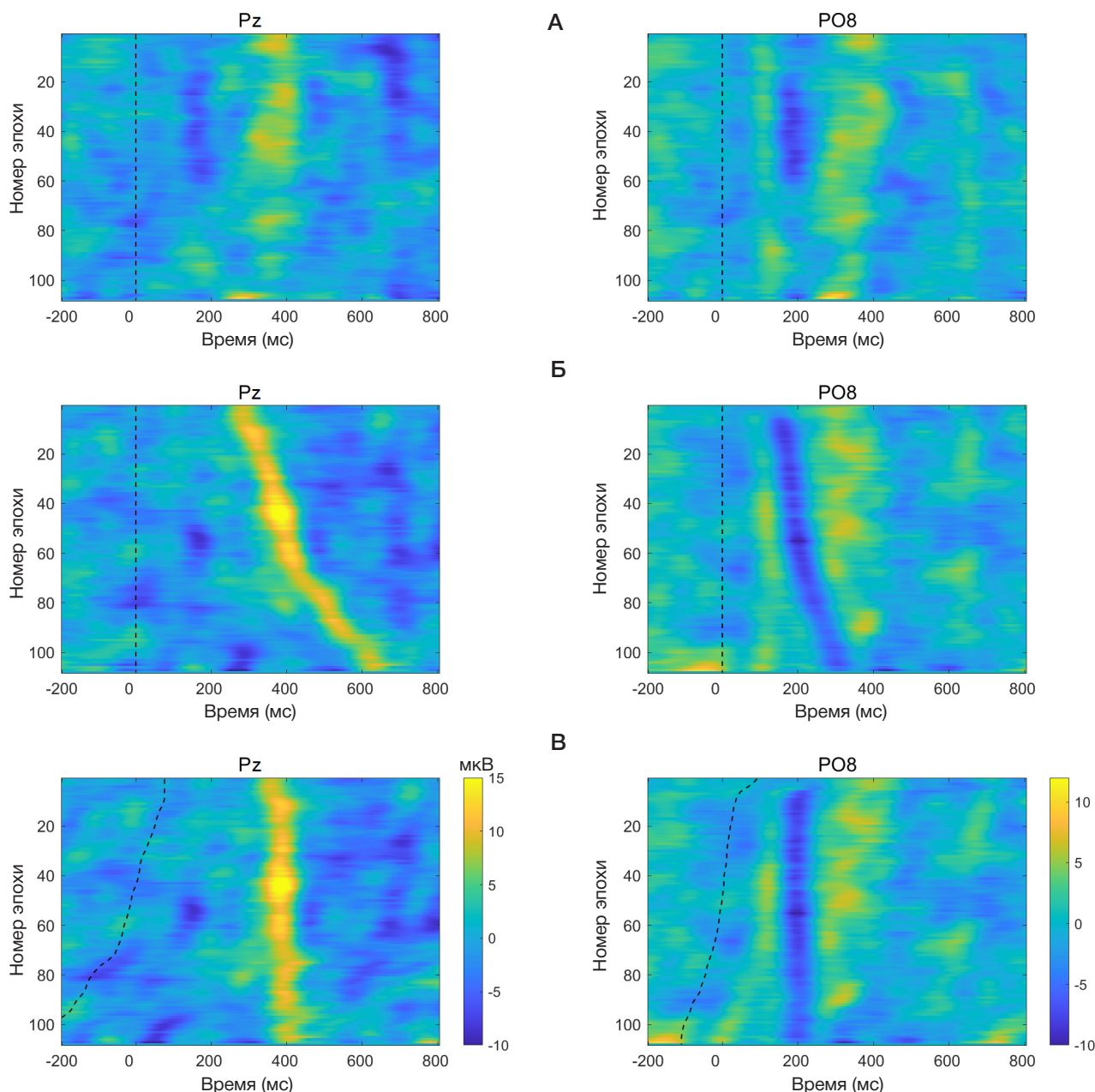


Рис. 1. Цветовая карта с единичными целевыми эпохами ЭЭГ для испытуемого № 1 в режиме «статичная матрица» в отведениях Pz и PO8. По горизонтали — время (мс), по вертикали — единичные эпохи (с порядковыми номерами), отсортированные сверху вниз (со скользящим сглаживанием по вертикали в 10 эпохах). **А.** Очередность эпох согласно реальной хронологии предъявления. **Б.** Эпохи отсортированы от меньшей к большей латентности пика P300 (в Pz) или N1 (в PO8). В случае **А** и **Б** эпохи синхронизированы по времени предъявления стимула (вертикальная черная пунктирная линия). **В.** Эпохи скорректированы относительно латентности пика (черная пунктирная линия отражает момент подачи стимула)

значения времени, по вертикали — последовательные индивидуальные эпохи, а цветом кодировали значения амплитуды [11]. Данный способ позволяет отображать различные варианты группировки отдельных эпох и нагляднее представить эффекты их вариативности. На рис. 1 представлен пример такого отображения целевых эпох для одного из испытуемых в режиме «статичная матрица» для каналов Pz и PO8. На рис. 1А очередность следования эпох сверху вниз отражает их реальную хронологию предъявления, а на рис. 1Б эпохи отсортированы таким образом, что выше располагаются эпохи с более ранней латентностью компонента P300 (в Pz) или N1 (в PO8), а ниже — с более поздней латентностью. На рис. 1В представлены эпохи, тайминг которых скорректирован по среднему значению латентности в данном режиме и канале. Для большей наглядности по вертикали

использовали сглаживание единичных эпох методом скользящего среднего по 10 эпохам.

На рис. 2 представлены ПСС, полученные при усреднении исходных и скорректированных эпох у того же испытуемого. В последнем случае амплитуды обоих пиков существенно превосходят исходный вариант усреднения ПСС без коррекции на индивидуальную латентность пиков. Данные различия были значимы у каждого испытуемого в каждом из режимов ($p < 0,001$ по парному критерию Стьюдента).

Для оценки описанного эффекта вариативности на амплитуды на групповом уровне использовали дисперсионный анализ, в который вводили значения амплитуд, рассчитанные в усредненных ПСС у каждого испытуемого. Значения амплитуд во всех режимах для компонентов P300 и N1 приведены на рис. 3. Амплитуда P300 и N1, рассчитанная при использовании скорректированных

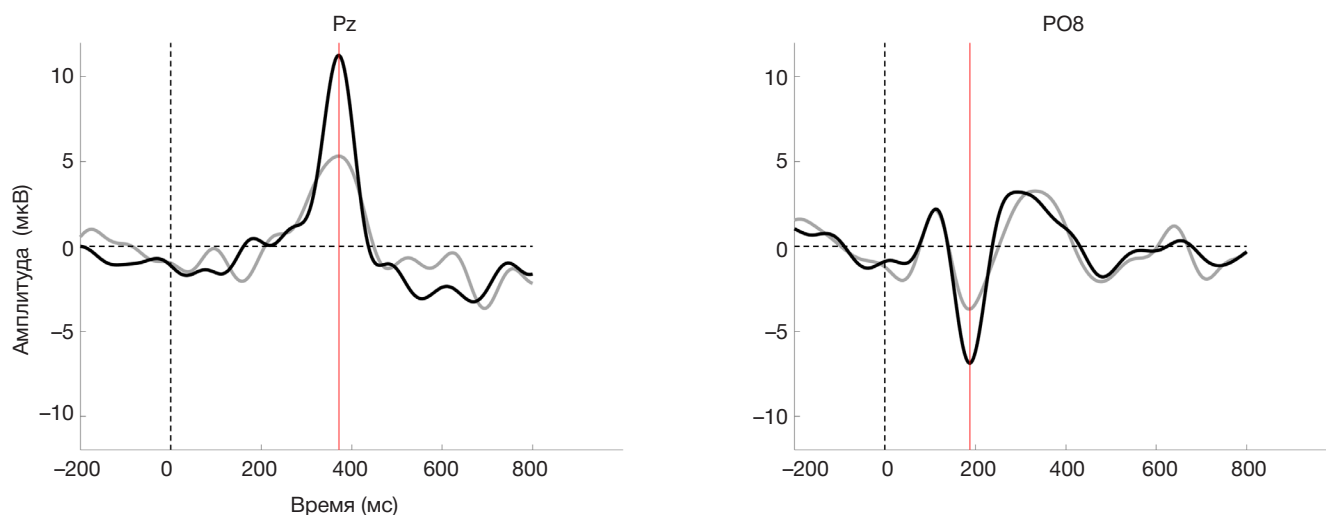


Рис. 2. Пример усредненных целевых ПСС (испытуемый № 1) в режиме «статичная матрица». Серая линия — при стандартном способе усреднения (без коррекции латентности), черная линия — при усреднении эпох, скорректированных по латентности пиков Р300 (отведение Pz) и N1 (отведение PO8). Вертикальная пунктирная линия (0 мс) соответствует времени подачи стимула, сплошная красная линия — латентности компонента в представленном отведении

по латентности эпох, была существенно выше, чем при обычном способе усреднения эпох. Двухфакторный дисперсионный анализ (фактор «коррекция латентности» — два уровня, фактор «тип движения» — четыре уровня, включая режим «статичная матрица») выявил значимый эффект коррекции латентности на амплитуду Р300: $F(1,11) = 95,7$, $\lambda = 0,10$ при $p = 0,000001$ и N1: $F(1,11) = 58,1$, $\lambda = 0,16$ при $p = 0,00001$. Фактор «тип движения матрицы» также был значим для Р300: $F(3,9) = 7,5$, $\lambda = 0,29$ при $p = 0,008$ (более низкая амплитуда в режиме с горизонтальным движением), но не для компонента N1.

При анализе факторов «коррекция латентности» (два уровня) и «скорость движения» (три уровня) также было выявлено значимое влияние фактора «коррекция латентности» на амплитуду компонента Р300: $F(1,11) = 88,5$, $\lambda = 0,11$ при $p = 0,000001$ и N1: $F(1,11) = 46,6$, $\lambda = 0,19$ при $p = 0,00003$, но не скорости движения матрицы. Кроме того, для компонента N1 было значимо взаимодействие этих двух факторов: $F(2,10) = 10,4$, $\lambda = 0,32$ при $p = 0,0036$ (тенденция более низкой амплитуды при наиболее быстром движении при обычном способе усреднения эпох).

При групповом анализе вариативности ПСС были выявлены некоторые статистически значимые эффекты для показателя MAD латентностей пиков. Фактор скорости движения (три уровня) оказался значимым для компонента N1 в отведениях PO8, O1 и O2: $F(2,22) = 4,4$ при $p = 0,024$,

$F(2,22) = 3,8$ при $p = 0,037$ и $F(2,22) = 4,9$ при $p = 0,017$ соответственно. В частности, post-hoc-анализ позволил выявить, что вариативность (значение MAD) была выше в режиме с самым быстрым движением по сравнению с более медленным движением матрицы в каналах в O1 и O2 ($p < 0,05$), а в PO8 различия имели уровень тенденции ($p < 0,1$). Значимого влияния фактора «тип движения» для компонента N1, а также факторов «тип движения» и «скорость движения» для компонента Р300 выявлено не было.

На рис. 4 представлена точность оффлайн-классификации во всех режимах для стандартного способа выделения ПСС, а также эпох, скорректированных по латентности пиков Р300 и N1. Двухфакторный дисперсионный анализ (фактор «коррекция латентности» — два уровня, фактор «тип движения» — четыре уровня) выявил значимый эффект коррекции латентности эпох на точность классификации: $F(1,11) = 102,7$, $\lambda = 0,09$ при $p = 0,00001$. Post-hoc-анализ показал, что точность во всех четырех режимах при коррекции эпох (94,7, 92,2, 93,2 и 94,8%) была выше, чем при стандартном выделении ПСС (78,3, 78,1, 78,3 и 76,1%) ($p < 0,0001$ для всех режимов). Двухфакторный дисперсионный анализ (фактор «коррекция латентности» — два уровня, фактор «скорость движения» — три уровня) выявил значимый эффект как способа расчета точности, так и скорости движения матрицы: $F(1,11) = 110,0$, $\lambda = 0,09$ при $p = 0,00000$ и $F(2,10) = 6,0$, $\lambda = 0,46$ при $p = 0,0196$, а также

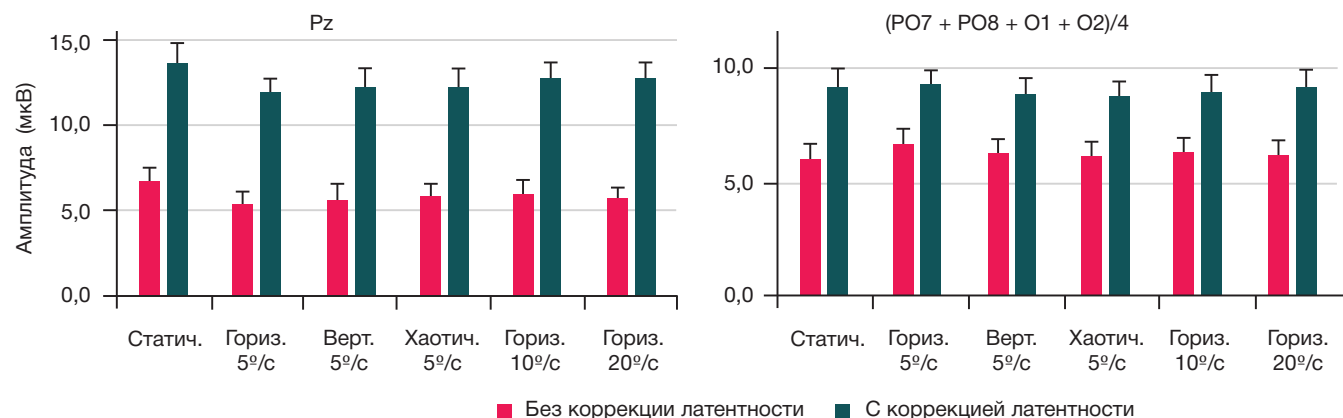


Рис. 3. Амплитуда компонентов Р300 и N1. Средняя по группе ($n = 12$) амплитуда компонентов Р300 и N1 (по модулю) во всех режимах при стандартном способе усреднения ПСС (без коррекции латентности), а также при усреднении эпох, скорректированных по латентности пиков Р300 и N1. Показаны среднее значение и стандартная ошибка среднего

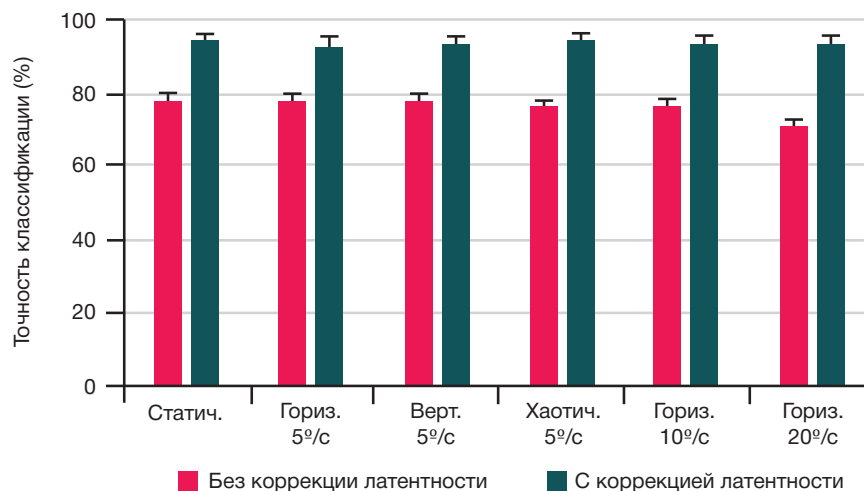


Рис. 4. Точность оффлайн-классификации. Средняя по группе ($n = 12$) точность оффлайн-классификации во всех режимах при стандартном способе выделения эпох (без коррекции латентности), а также при использовании эпох, скорректированных по латентности пиков P300 и N1. Показаны среднее значение и стандартная ошибка среднего

взаимодействие этих факторов: $F(2,10) = 11,5$, $\lambda = 0,30$ при $p = 0,0026$. Post-hoc анализ показал, что точность во всех трех режимах при коррекции эпох (92,2, 93,7 и 94,0%) была выше, чем при стандартном выделении ПСС (78,1, 76,7 и 71,2%) ($p < 0,0005$ для всех режимов). Кроме того, точность в режиме с самым быстрым движением (71,2%) была ниже, чем в двух других режимах (78,1 и 76,7%) ($p < 0,05$), но только в случае стандартного способа выделения ПСС (без коррекции латентности).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В целом результаты нашего исследования подтверждают, что вариативность ПСС характерна для ИМК-P300, она существенно влияет на форму компонентов ПСС и зависит от степени вовлечения ресурсов внимания. Коррекция вариативности единичных ЭЭГ-реакций на стимулы может значительно улучшать точность распознавания команд в ИМК-P300.

Несмотря на то что методика ПСС предполагает многократное усреднение реакций на стимул, в целом детектирование пиков единичных реакций вполне возможно при определенных параметрах обработки сигнала. Это хорошо иллюстрируют и наши данные (см. рис. 1), и результаты других работ [9, 10, 12]. Более того, такой анализ единичных эпох позволяет вводить коррекцию на вариативность латентности пиков в отдельных реализациях предъявления стимула, что в итоге приводит к лучшему выделению и увеличению амплитуды исследуемых компонентов потенциалов (рис. 2). Несмотря на многократно описанный феномен вариативности латентностей ПСС в литературе, наличие в ИМК-P300 этих эффектов нельзя считать самоочевидным, поскольку по сравнению с типичными психофизиологическими исследованиями темп стимуляции в ИМК обычно существенно выше. С одной стороны, это могло бы снижать вариативность, стабилизируя временной разброс реакций, с другой — увеличивать, осложняя корректное детектирование стимула при более быстром предъявлении, поскольку вариации во внимании могут приводить к увеличению вариативности ПСС [20]. В целом причины вариативности связывают с варьирующим временем оценки стимула, которое каждый раз определено временем, необходимым для восприятия и категоризации стимула [26]. Мы показали, что учет эффектов вариативности

может существенно увеличить амплитуды компонентов, связанных с вниманием к целевым стимулам, как на индивидуальном, так и на групповом уровне (рис. 2 и 3).

Несмотря на отсутствие значимых эффектов различных типов и скоростей движения матрицы ИМК-P300 на амплитуды компонентов ПСС, индекс MAD показал более высокую вариативность компонента N1 при более быстром движении матрицы. Острота зрения снижается при увеличении скорости объектов слежения [27], что связывают с увеличением затрат внимания при больших скоростях. Поскольку вариативность компонентов ПСС связана с особенностями работы глазодвигательной системы [28], вариации внимания и необходимость слежения за ячейками матрицы на большой скорости могли приводить к увеличению вариативности N1 в данном режиме. Это согласуется также со снижением амплитуды данного компонента в разностных ПСС в режиме, обнаруженном нами и ранее [25]. Причем эффект характерен для этого более раннего компонента, чувствительного к целевым событиям в точке фиксации взгляда [29], а не более позднего P300.

Эффекты коррекции латентности компонентов ПСС имеют не только фундаментальный, но и прикладной интерес, поскольку нами было показано существенное увеличение точности классификации целевых стимулов в рассмотренном варианте ИМК-P300 (рис. 4). Вопрос вариативности индивидуальных латентностей в ИМК и влияние ее на показатели классификации изучали и ранее. Например, показана корреляция точности классификации со степенью вариативности и сделано предположение, что именно последнее явление может лежать в основе низкой эффективности работы для некоторых испытуемых [17]. Однако предложенный авторами работы вариант предусматривал оценку вариативности не по исходным пикам в эпохах ЭЭГ, а по амплитудным значениям выхода классификатора, что кажется менее логичным и эффективным, поскольку внешние факторы (шум и пр.) могут влиять на значения выхода классификатора. В другой работе точность в ИМК-P300 действительно росла при коррекции латентности, но это было показано только при анализе узкого окна для компонента P300, при сравнении же с базовым подходом различий в классификации не наблюдалось [26]. Кроме того, авторы сами подчеркивают несостоятельность своего алгоритма для онлайн-работы, поскольку он предусматривал наличие у каждой эпохи целевой/нецелевой метки, что возможно лишь при оффлайн-анализе. Показан

положительный эффект на точность классификации по сравнению со стандартным подходом при коррекции латентности обоих компонентов P300 и N1, вклад которых одинаково высок [30], что может быть использовано и в онлайн-режиме ИМК, поскольку коррекцию использовали и в целевых, и в нецелевых эпохах. Важно отметить также, что исходная точность в режиме с наибольшей скоростью движения была ниже (71%), чем в других режимах (76–78%), в то время как после коррекции латентности точность во всех режимах стала примерно одинаково высокой (92–95%), что подчеркивает особую ценность данного способа коррекции в подобном и других потенциально более требовательных по ресурсам внимания режимах работы ИМК.

ВЫВОДЫ

Использованный в работе подход к анализу единичных эпох ЭЭГ позволил выявить ряд особенностей вариативности

латентностей компонентов ПСС, возникающих при работе пользователя с модифицированной стимульной средой ИМК-Р300. Было показано, что учет такой вариативности позволяет не только более эффективно выделять компоненты ПСС, связанные с вниманием к целевым стимулам, но и повысить точность классификации команд пользователя интерфейса. Кроме того, на примере модификации ИМК-Р300 с движущейся стимульной матрицей был показан более высокий вклад такого способа коррекции латентностей в более когнитивно затратных условиях (высокая скорость движения стимульных объектов). В совокупности наши результаты показывают важность учета вариативности компонентов ПСС при разработке стимульной среды ИМК-Р300 и дают основу для создания более эффективных систем нейроуправления на основе ПСС, ценность которых может быть особенно высокой для людей со сниженным уровнем внимания.

Литература

- Abiri R, Borhani S, Sellers EW, Jiang Y, Zhao X. A comprehensive review of EEG-based brain-computer interface paradigms. *J Neural Eng.* 2019; 16 (1): 011001.
- Yang S, Li R, Li H, Xu K, Shi Y, Wang Q, et al. Exploring the Use of Brain-Computer Interfaces in Stroke Neurorehabilitation. *Biomed Res Int.* 2021; 9967348.
- Eldeeb S, Susam BT, Akcakaya M, Conner CM, White SW, Mazefsky CA. Trial by trial EEG based BCI for distress versus non distress classification in individuals with ASD. *Sci Rep.* 2021; 11 (1): 6000.
- Ганин И. П., Косиченко Е. А., Соколов А. В., Иоаннисянц О. М., Арефьев И. М., Басова А. Я., и др. Адаптация технологии интерфейсов мозг-компьютер на волне P300 для оценивания состояния больных нервной анорексией. *Вестник Российского государственного медицинского университета.* 2019; 2: 36–43.
- Carelli L, Solca F, Faini A, Meriggi P, Sangalli D, Cipresso P, Riva G, Ticozzi N, Ciammola A, Silani V, Poletti B. Brain-Computer Interface for Clinical Purposes: Cognitive Assessment and Rehabilitation. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 1695290.
- Luck SJ. An introduction to the event related potential technique. MIT Press, Cambridge, MA, 2014.
- Farwell LA, Donchin E. Talking off the top of your head: toward a mental prosthesis utilizing event-related brain potentials. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology.* 1988; 70: 510–23.
- Rezeika A, Benda M, Stawicki P, Gemblar F, Saboor A, Volosyak I. Brain-Computer Interface Spellers: A Review. *Brain Sciences.* 2018; 8 (4): 57.
- Zang S, Zhou C, Chao F. Estimation of Event-Related Potentials from Single-Trial EEG. *UK Workshop on Computational Intelligence.* Springer, Cham. 2021; 1409: 415–27.
- Ouyang G, Hildebrandt A, Sommer W, Zhou C. Exploiting the intra-subject latency variability from single-trial event-related potentials in the P3 time range: A review and comparative evaluation of methods. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017; 75: 1–21.
- Burwell SJ, Makeig S, Iacono WG, Malone SM. Reduced preemption positivity during the stimulus-response interval precedes errors: Using single-trial and regression ERPs to understand performance deficits in ADHD. *Psychophysiology.* 2019; 56 (9): e13392.
- Dowdall JR, Luczak A, Tata MS. Temporal variability of the N2pc during efficient and inefficient visual search. *Neuropsychologia.* 2012; 50 (10): 2442–53.
- Kutas M, McCarthy G and Donchin E. Augmenting mental chronometry: the P300 as a measure of stimulus evaluation time. *Science.* 1977; 197 (4305): 792–5.
- Zisk AH, Borgheai SB, McLinden J, Hosni SM, Deligani RJ, Shahriari Y. P300 latency jitter and its correlates in people with amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurophysiology.* 2021; 132 (2): 632–42.
- Kim JS, Lee YJ, Shim SH. What Event-Related Potential Tells Us about Brain Function: Child-Adolescent Psychiatric Perspectives. *Soa Chongsongyon Chongsin Uihak.* 2021; 32 (3): 93–98.
- Riggins T, Scott LS. P300 development from infancy to adolescence. *Psychophysiology.* 2020; 57 (7): e13346.
- Thompson DE, Warschausky S, Huggins JE. Classifier-based latency estimation: a novel way to estimate and predict BCI accuracy. *Journal of neural engineering.* 2013; 10 (1): 016006.
- Picton TW, Bentin S, Berg P, Donchin E, Hillyard SA, Johnson R, et al. Guidelines for using human event-related potentials to study cognition: recording standards and publication criteria. *Psychophysiology.* 2000; 37 (2): 127–52.
- Dinstein I, Heeger DJ, Behrmann M. Neural variability: friend or foe? *Trends Cogn Sci.* 2015; 19 (6): 322–28.
- Kovarski K, Malvy J, Khanna RK, Arsène S, Batty M, Latinus M. Reduced visual evoked potential amplitude in autism spectrum disorder, a variability effect? *Translational Psychiatry.* 2019; 9 (1): 1–9.
- Gonen-Yaacovi G, Arazi A, Shahar N, Karmo A, Haar S, Meiran N, et al. Increased ongoing neural variability in ADHD. *Cortex.* 2016; 81: 50–63.
- Zeba MZ, Friganović K, Palmović M, Išgum V, Cifrek M. Assessment of mental fatigue during examination period with P300 oddball paradigm. In 2019 42nd International Convention on Information and Communication Technology, Electronics and Microelectronics (MIPRO), IEEE. 2019: 1479–84.
- McFarland DJ, Vaughan TM. BCI in practice. *Progress in brain research.* 2016; 228: 389–404.
- Ганин И. П., Ким С. А., Либуркина С. П., Галкина Н. В., Лужин А. О., Майорова Л. А., et al. Набор текста пациентами с постинсультной афазией в комплексе «НейроЧат» на основе технологии интерфейсов мозг-компьютер на волне P300. *Журн. высш. нерв. деят.* 2020; 70 (4): 435–45.
- Shishkin SL, Ganin IP, Kaplan AY. Event-related potentials in a moving matrix modification of the P300 brain-computer interface paradigm. *Neuroscience letters.* 2011; 496 (2): 95–99.
- Aricò P, Aloise F, Schettini F, Salinari S, Mattia D, Cincotti F. Influence of P300 latency jitter on event related potential-based brain-computer interface performance. *Journal of neural engineering.* 2014; 11 (3): 035008.
- Schütz AC, Delipetkos E, Braun DI, Kerzel D, Gegenfurtner KR. Temporal contrast sensitivity during smooth pursuit eye movements. *Journal of Vision.* 2007; 7 (13): 3–3.
- Zhang B, Stevenson SS, Cheng H, Laron M, Kumar G, Tong J, et al. Effects of fixation instability on multifocal VEP (mfVEP) responses

in amblyopes. *Journal of Vision*. 2008; 8 (3): 16.

29. Aloise F, Aricò P, Schettini F, Riccio A, Salinari S, Mattia D, et al. A covert attention P300-based brain-computer interface: Geospell. *Ergonomics*. 2012; 55 (5): 538–51.
 30. McCane LM, Sellers EW, McFarland DJ, Mak JN, Carmack CS, Zeitlin D, et al. Brain-computer interface (BCI) evaluation in people with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2014; 15 (3–4): 207–15.
- References**
1. Abiri R, Borhani S, Sellers EW, Jiang Y, Zhao X. A comprehensive review of EEG-based brain-computer interface paradigms. *J Neural Eng*. 2019; 16 (1): 011001.
 2. Yang S, Li R, Li H, Xu K, Shi Y, Wang Q, et al. Exploring the Use of Brain-Computer Interfaces in Stroke Neurorehabilitation. *Biomed Res Int*. 2021; 9967348.
 3. Eldeeb S, Susam BT, Akcakaya M, Conner CM, White SW, Mazefsky CA. Trial by trial EEG based BCI for distress versus non distress classification in individuals with ASD. *Sci Rep*. 2021; 11 (1): 6000.
 4. Ganin IP, Kosichenko EA, Sokolov AV, Ioannisyanc OM, Arefev IM, Basova AY, Kaplan AY. Adaptation of the p300-based brain-computer interface for anorexia nervosa patients state evaluation. *Bulletin of RSMU*. 2019; 2: 32–38.
 5. Carelli L, Solca F, Faini A, Meriggi P, Sangalli D, Cipresso P, Riva G, Ticozzi N, Ciammola A, Silani V, Poletti B. Brain-Computer Interface for Clinical Purposes: Cognitive Assessment and Rehabilitation. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 1695290.
 6. Luck SJ. An introduction to the event related potential technique. MIT Press, Cambridge, MA, 2014.
 7. Farwell LA, Donchin E. Talking off the top of your head: toward a mental prosthesis utilizing event-related brain potentials. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1988; 70: 510–23.
 8. Rezeika A, Benda M, Stawicki P, Gemblar F, Saboor A, Volosyak I. Brain-Computer Interface Spellers: A Review. *Brain Sciences*. 2018; 8 (4): 57.
 9. Zang S, Zhou C, Chao F. Estimation of Event-Related Potentials from Single-Trial EEG. *UK Workshop on Computational Intelligence*. Springer, Cham. 2021; 1409: 415–27.
 10. Ouyang G, Hildebrandt A, Sommer W, Zhou C. Exploiting the intra-subject latency variability from single-trial event-related potentials in the P3 time range: A review and comparative evaluation of methods. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017; 75: 1–21.
 11. Burwell SJ, Makeig S, Iacono WG, Malone SM. Reduced premovement positivity during the stimulus-response interval precedes errors: Using single-trial and regression ERPs to understand performance deficits in ADHD. *Psychophysiology*. 2019; 56 (9): e13392.
 12. Dowdall JR, Luczak A, Tata MS. Temporal variability of the N2pc during efficient and inefficient visual search. *Neuropsychologia*. 2012; 50 (10): 2442–53.
 13. Kutas M, McCarthy G and Donchin E. Augmenting mental chronometry: the P300 as a measure of stimulus evaluation time. *Science*. 1977; 197 (4305): 792–5.
 14. Zisk AH, Borgheai SB, McLinden J, Hosni SM, Deligani RJ, Shahriari Y. P300 latency jitter and its correlates in people with amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurophysiology*. 2021; 132 (2): 632–42.
 15. Kim JS, Lee YJ, Shim SH. What Event-Related Potential Tells Us about Brain Function: Child-Adolescent Psychiatric Perspectives. *Soa Chongsongyon Chongsin Uihak*. 2021; 32 (3): 93–98.
 16. Riggins T, Scott LS. P300 development from infancy to adolescence. *Psychophysiology*. 2020; 57 (7): e13346.
 17. Thompson DE, Warschausky S, Huggins JE. Classifier-based latency estimation: a novel way to estimate and predict BCI accuracy. *Journal of neural engineering*. 2013; 10 (1): 016006.
 18. Picton TW, Bentin S, Berg P, Donchin E, Hillyard SA, Johnson R, et al. Guidelines for using human event-related potentials to study cognition: recording standards and publication criteria. *Psychophysiology*. 2000; 37 (2): 127–52.
 19. Dinstein I, Heeger DJ, Behrmann M. Neural variability: friend or foe? *Trends Cogn Sci*. 2015; 19 (6): 322–28.
 20. Kovarski K, Malvy J, Khanna RK, Arsène S, Batty M, Latinus M. Reduced visual evoked potential amplitude in autism spectrum disorder, a variability effect? *Translational Psychiatry*. 2019; 9 (1): 1–9.
 21. Gonen-Yaacovi G, Arazi A, Shahar N, Karmo A, Haar S, Meiran N, et al. Increased ongoing neural variability in ADHD. *Cortex*. 2016; 81: 50–63.
 22. Zeba MZ, Friganović K, Palmović M, Išgum V, Cifrek M. Assessment of mental fatigue during examination period with P300 oddball paradigm. In 2019 42nd International Convention on Information and Communication Technology, Electronics and Microelectronics (MIPRO), IEEE. 2019: 1479–84.
 23. McFarland DJ, Vaughan TM. BCI in practice. *Progress in brain research*. 2016; 228: 389–404.
 24. Ganin IP, Kim SA, Liburkina SP, Galkina NV, Luzhin AO, Majorova LA, et al. Nabor teksta pacientami s postinsul'noy afaziej v komplekse «NejroChat» na osnove tehnologij interfejsov mozg-komp'yuter na volne P300. *Zhurn. vyssh. nerv. deyat.* 2020; 70(4): 435–45. Russian.
 25. Shishkin SL, Ganin IP, Kaplan AY. Event-related potentials in a moving matrix modification of the P300 brain-computer interface paradigm. *Neuroscience letters*. 2011; 496 (2): 95–99.
 26. Aricò P, Aloise F, Schettini F, Salinari S, Mattia D, Cincotti F. Influence of P300 latency jitter on event related potential-based brain-computer interface performance. *Journal of neural engineering*. 2014; 11 (3): 035008.
 27. Schütz AC, Delipetkos E, Braun DI, Kerzel D, Gegenfurtner KR. Temporal contrast sensitivity during smooth pursuit eye movements. *Journal of Vision*. 2007; 7 (13): 3–3.
 28. Zhang B, Stevenson SS, Cheng H, Laron M, Kumar G, Tong J, et al. Effects of fixation instability on multifocal VEP (mfVEP) responses in amblyopes. *Journal of Vision*. 2008; 8 (3): 16.
 29. Aloise F, Aricò P, Schettini F, Riccio A, Salinari S, Mattia D, et al. A covert attention P300-based brain-computer interface: Geospell. *Ergonomics*. 2012; 55 (5): 538–51.
 30. McCane LM, Sellers EW, McFarland DJ, Mak JN, Carmack CS, Zeitlin D, et al. Brain-computer interface (BCI) evaluation in people with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2014; 15 (3–4): 207–15.

ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ ГЛАЗНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ И КАЧЕСТВА ЖИЗНИ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Э. М. Юнусова [✉], Т. Р. Мухамадеев, Б. А. Бакиров

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

К хроническим миелопролиферативным заболеваниям относят группу гемобластозов, характеризующуюся разрастанием миелоидных линий гемопоэза и изменением показателей периферической крови. Целью работы было оценить частоту офтальмологических нарушений и качество жизни вследствие изменений зрительных функций у пациентов с хроническими миелопролиферативными заболеваниями. Пациенты с данной группой гемобластозов ($n = 41$) для оценки качества жизни были проанкетированы при помощи специализированного медицинского опросника «National eye institute visual function questionnaire-25», обследованы стандартными и специальными неинвазивными методами. Большинство из них предъявляли жалобы на ухудшение зрения, дискомфорт, ощущение инородного тела в глазах. По данным анкетирования, многие больные оценивают свое общее состояние здоровья и зрения как удовлетворительное, подавляющая часть опрошенных (68,3%) испытывают беспокойство по поводу зрения. По результатам объективного офтальмологического обследования, у большинства пациентов выявлены различные виды патологий рефракции (61%), штопоробразное расширение и извитость сосудов конъюнктивы и сетчатки (77,9%), частые субконъюнктивальные кровоизлияния (39%), расширение периневрального пространства зрительных нервов (36,6%). При хронических миелопролиферативных заболеваниях ухудшается качество жизни пациентов, возможно поражение различных структур глаза. Крайне важен междисциплинарный подход к ведению таких больных с целью ранней диагностики и коррекции офтальмологических нарушений.

Ключевые слова: хронические миелопролиферативные заболевания, глазные проявления, качество жизни

Вклад авторов: Э. М. Юнусова — сбор и обработка материала, написание текста; Т. Р. Мухамадеев — консультирование, окончательное редактирование рукописи; Б. А. Бакиров — концепция и дизайн исследования, консультирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом БГМУ (протокол № 10 от 25 ноября 2020 г.); все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Эльвира Маратовна Юнусова
ул. Ленина, д. 3, 450008, г. Уфа, Россия; zainullina16@mail.ru

Статья получена: 02.05.2022 **Статья принята к печати:** 17.05.2022 **Опубликована онлайн:** 29.05.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.027

ASSESSMENT OF OCULAR MANIFESTATION FREQUENCY AND QUALITY OF LIFE IN CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS

Yunusova EM [✉], Mukhamadeev TR, Bakirov BA

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Chronic myeloproliferative disorders (CMPD) include hemoblastoses with abnormal proliferation of myeloid lineages and concomitant alterations in the peripheral blood indicators. The aim of this study was to assess the frequency and structure of ophthalmic complications as a quality of life factor in patients with CMPD. A group of patients with hemoblastoses of this type ($n = 41$) were surveyed using National Eye Institute Visual Function Questionnaire-25 along with a comprehensive examination by noninvasive ophthalmological techniques. The patients typically reported impaired visual acuity, visual discomfort and foreign body sensation in the eyes. Though many of the patients assessed their general health and vision as satisfactory, the vast majority (68.3%) expressed serious concerns about their visual abilities. The ophthalmological examination revealed various defects including refractive errors (61%), corkscrew dilation and tortuosity of conjunctival and retinal vessels (77.9%), recurrent subconjunctival hemorrhages (39%) and dilated optic nerve sheaths (36.6%). The survey data indicate that visual impairments significantly affect quality of life in patients with CMPD. Overall, the results underscore the importance of interdisciplinary approach in the management of patients with CMPD to enable early diagnosis and feasible correction of the ophthalmic component.

Keywords: chronic myeloproliferative disorders, ocular manifestations, quality of life

Author contribution: Yunusova EM — data collection and analysis, writing of the manuscript; Mukhamadeev TR — consulting, scientific editing of the manuscript; Bakirov BA — study concept and design, consulting.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethical Review Board at the Bashkir State Medical University (Protocol № 10 of 25 November 2020); all patients provided written informed consent for participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elvira M. Yunusova
Lenina, 3, 450008, Ufa, Russia; zainullina16@mail.ru

Received: 02.05.2022 **Accepted:** 17.05.2022 **Published online:** 29.05.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.027

Хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ) характеризуются клональным нарушением полипотентных стволовых клеток костного мозга и приводят к избыточному увеличению клеток крови, сохраняющих способность к длительной дифференцировке [1]. Среди ХМПЗ наиболее распространены хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), истинная полицитемия (ИП). Как известно, данная патология крови может поражать другие органы и системы, в том числе и орган зрения. Большинство

офтальмологических проявлений ХМПЗ связаны с нарушением гемодинамики и реологии крови. Часто эти процессы вызваны изменением количества форменных элементов в периферической крови на фоне угнетения нормального кроветворения. Несомненно, важную роль в патогенезе клинических проявлений ХМПЗ играет также дисбаланс свертывающей и противосвертывающей систем крови вследствие активирования факторов свертывания, коагулянтов, выделяемых бластными клетками [2]. Нарушение гемодинамики крови ведет

к повышению проницаемости, дисфункции эндотелия сосудов и гипоперфузии тканей глаза. Важно отметить также, что специфичные лекарственные препараты, используемые для лечения гемобластозов, сами могут быть окулотоксичны. В литературе описаны случаи возникновения конъюнктивальных кровоизлияний, двустороннего периорбитального отека и синдрома сухого глаза на фоне приема пациентами ингибиторов тирозинкиназы при лечении ХМПЗ [3, 4]. Целью нашей работы была оценка частоты глазных изменений и качества жизни (КЖ) у пациентов при ХМПЗ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

С октября 2020 г. по ноябрь 2021 г. нами был обследован 41 пациент с ХМПЗ. Критерии включения в исследование: возраст старше 18 лет; наличие верифицированного диагноза, входящего в группу ХМПЗ. Критерии исключения: беременность и кормление грудью на момент обследования; установленные диагнозы сахарного диабета и артериальной гипертензии. Среди включенных в обследование было 29 женщин (70,7%), 12 мужчин (29,3%); средний возраст — 51 ± 14 лет. Пациентов с ХМПЗ было 32 (78%), с ЭТ — пять (12,2%), с ИП — четыре (9,8%). Длительность заболевания составила 11 ± 6 лет. Ингибиторы тирозинкиназы первого и второго поколений в качестве терапии принимали 32 (78%) пациента, гидроксикарбамид — пять (12,2%), интерферон α -2b — три (7,3%), и один (2,4%) пациент был впервые выявлен гематологом и не проходил ранее специфического лечения.

Важно отметить, что нарушение зрительных функций может оказывать негативное влияние на состояние общего здоровья, социальное функционирование и КЖ больных. В медицине термин «качество жизни» отражает способность пациента в зависимости от своего состояния вести повседневную жизнь. В исследовании использовали специализированный опросник «National eye institute visual function questionnaire-25» (NEI-VFQ-25), включающий в себя 25 вопросов и отражающий общее состояние здоровья и характеристику зрительных функций опрошенных. Все вопросы разделены на 12 шкал: «общее состояние здоровья», «общая оценка зрения», «глазная боль», «зрение вдаль», «зрение вблизи», «периферическое зрение», «цветоощущение», «вождение автомобиля», «социальное функционирование», «психическое здоровье», «ролевые ограничения», «зависимость от посторонней помощи». Для расчета по шкале использовали стандартный алгоритм «шкала Ликерта» в диапазоне от 0 (минимальное значение) до 100 баллов (максимальное), что соответствует полному здоровью. Контрольная группа из 30 добровольцев без ХМПЗ, проходивших анкетирование, соответствовала по полу и возрасту исследуемой группе. Для оценки КЖ использованы методы описательной статистики, для проверки нормальности распределения применяли тест Шапиро–Уилка. Поскольку распределение признаков в обеих группах не являлось нормальным, для их сравнения применили тест Манна–Уитни. Статистический анализ выполняли с использованием прикладной компьютерной программы Microsoft Excel 2204 (Microsoft Corporation; США). Достоверность различий считали установленной при $p < 0,05$.

Помимо анкетирования всем пациентам было проведено стандартное офтальмологическое обследование, включающее визометрию, авторефрактометрию,

тонометрию, периметрию, биомикроскопию, офтальмоскопию и специальные неинвазивные обследования, включающие оптическую когерентную томографию (ОКТ) макулярной области и диска зрительного нерва, ОКТ с функцией ангиографии макулярной области и диска зрительного нерва на томографе Avanti RTVue XR (Optovue; США), фотографирование глазного дна на фундус-камере VISUCAM 524/224 (Carl Zeiss; Германия), ультразвуковое исследование (УЗИ) глазного яблока и орбиты с доплерографией сосудов на приборе MySono U5 (Samsung-Medison; Южная Корея).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Примечательно, что 88% участников исследования ранее не проходили комплексное обследование у офтальмолога. Основными офтальмологическими жалобами во время приема были ухудшение зрения — 28 пациентов (68,3%), дискомфорт, периодическое ощущение инородного тела в глазах — 12 (29,3%), слезотечение — 10 (24,4%), сухость в глазах — 8 (19,5%), периодическое затуманенное зрение — 7 (17%), искажение форм предметов — 2 (4,9%). По результатам анкетирования, большинство пациентов с ХМПЗ — 26 (63,4%) человек — оценили свое общее здоровье как удовлетворительное. Свое зрение посчитали хорошим 12 участников (29,3%), удовлетворительным — 20 (48,8%) и плохим 9 (22%). Подавляющее большинство обследованных — 28 человек (68,3%) отмечали, что испытывают чувство беспокойства по поводу своего зрения, причем 13 (31,7%) из них — постоянно. По результатам подсчета средних значений ответов по всем шкалам опросника, в группе пациентов с ХМПЗ были достоверно низкие показатели по шкалам по сравнению с группой контроля «общее состояние здоровья» ($34,1 \pm 1,9$; $50,9 \pm 3,8$; $p < 0,001$), «общая оценка зрения» ($61,5 \pm 2,3$; $77,2 \pm 2,8$; $p < 0,001$), «вождение автомобиля» ($47 \pm 12,7$; $163 \pm 23,7$; $p < 0,001$), достоверно высокий показатель по шкале «глазная боль» ($109,8 \pm 4,1$; $95,9 \pm 3,5$; $p < 0,05$) по сравнению с группой контроля. По остальным шкалам достоверных различий между пациентами и лицами группы контроля не наблюдалось.

По результатам объективного обследования, офтальмологические нарушения выявлены у 38 пациентов (92,7%). Так, нарушение рефракции было выявлено у 25 (61%) обследованных (миопия — у 9 (36%), гиперметропия — у 6 (24%), пресбиопия — у 5 (20%) и астигматизм — тоже у 5 (20%) человек). Двусторонний периорбитальный отек невоспалительного генеза был обнаружен у 3 (7,3%) пациентов, синдром сухого глаза — у 6 (14,6%). В 10 (24,3%) случаях выявлена неравномерность, штопорообразное расширение сосудов конъюнктивы, прерывистый ток крови в них. Частые субконъюнктивальные кровоизлияния отмечены у 16 (39%) пациентов с ХМПЗ, штопорообразное расширение и извитость сосудов на глазном дне — у 22 (53,6%) человек. При УЗИ глазного яблока и орбиты с доплерографией сосудов было обнаружено расширение периневрального пространства зрительных нервов у 15 (36,6%) пациентов, а также снижение скорости кровотока в глазных артериях у 7 (17%) обследованных. Серозная отслойка нейроретина сетчатки — у 2 (4,9%) пациентов (по данным ОКТ макулярной области). Неоваскуляризация сетчатки — у 2 (4,9%) пациентов (по данным ОКТ с ангиографией макулярной области). Первичная открытоугольная глаукома была обнаружена у 2 (4,9%) человек, причем у одного из них данный диагноз

был впервые выявлен при обращении к нам при проведении ОКТ диска зрительного нерва. Кератоконус, незрелая катаракта, деструкция стекловидного тела, ламеллярный разрыв макулы, макулярный отек и атрофия зрительного нерва ишемического генеза были обнаружены по одному случаю (2,4%) из всех обследованных нами пациентов с ХМПЗ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При ХМПЗ может ухудшаться КЖ пациентов как на фоне общего заболевания, так и вследствие проблем со зрением, кроме того, могут быть поражены многие структуры глаз. Частота поражения глаз при гемобластозах составляет 14–53%. Клинические проявления поражения глаз при опухолевых заболеваниях кроветворной ткани делят на первичные (прямая лейкемическая инфильтрация органа зрения) и вторичные (изменения вследствие реологических нарушений крови и на фоне проводимой терапии) [5]. Прямое вовлечение глаз значительно чаще регистрируют при острых лейкозах, чем при хронических [6]. На сегодняшний день не так много литературных источников, достоверно описывающих разницу между офтальмологическими поражениями при острых и хронических пролиферативных заболеваниях крови, однако, по данным зарубежных авторов, при острых гемобластозах глазные проявления встречаются чаще, чем при хронических [7]. Так, распространенность лейкозной офтальмопатии составила 68% в случаях острого миелоидного лейкоза, 42% — в случаях острого лимфоидного лейкоза, 33% — в случаях хронического лимфоидного лейкоза и 13% — в случаях хронического миелоидного лейкоза. Такие грозные осложнения, как субгидалоидное кровоизлияние с участием заднего полюса (20%) и кровоизлияние в стекловидное тело (10%), были выявлены исключительно у пациентов с острыми лейкозами [8]. В то же время в работе [7] упоминается о том, что при хронических лейкозах глазные проявления у пациентов встречаются чаще, чем при острых.

Частой жалобой наших пациентов были спонтанные субконъюнктивальные кровоизлияния примерно раз в 2–3 месяца (рис. 1). Примечательно, что в основе большинства офтальмологических проявлений при гемобластозах лежит геморрагический синдром на фоне угнетения нормального кроветворения из-за усиления сосудистой проницаемости. Повышенная кровоточивость может быть также следствием приема специфических таргетных препаратов при ХМПЗ [3].

Выявленные у большинства наших пациентов штопорообразное расширение калибра и извитость сосудов конъюнктивы и сетчатки (рис. 2, 3) могут быть следствием повышенной вязкости крови у больных [9], что подтверждалось лабораторно.

Состояние гипервязкости крови у пациентов со злокачественными заболеваниями крови может быть также причиной развития внутричерепной гипертензии (ВЧГ), обусловленной плохим всасыванием спинномозговой жидкости в дуральные венозные синусы [10]. Прямым признаком ВЧГ является расширение оболочек зрительных нервов при УЗИ глазного яблока и орбиты с доплерографией сосудов, обнаруженное у обследованных более чем в трети случаев (рис. 4). Всем пациентам с данной находкой была проведена магнитная резонансная томография головного мозга, по результатам которой у всех обнаружены признаки ВЧГ без очаговой патологии.

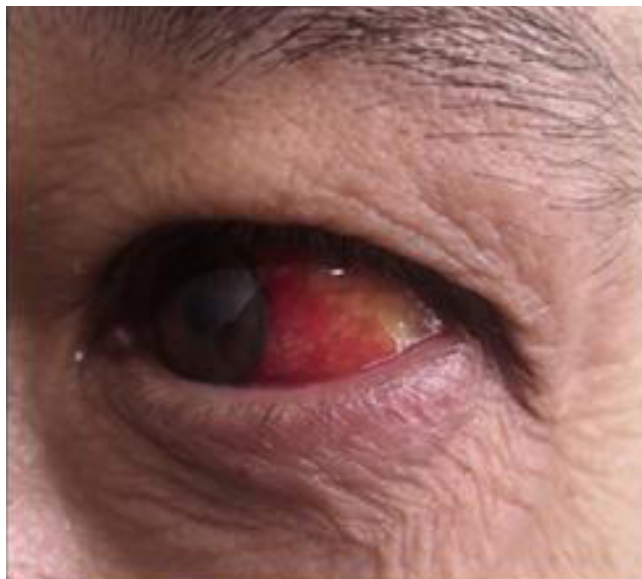


Рис. 1. Субконъюнктивальное кровоизлияние у пациента Н. с ХМЛ



Рис. 2. Штопорообразное расширение и извитость сосудов конъюнктивы у пациента А. с ХМЛ



Рис. 3. Штопорообразное расширение и извитость сосудов сетчатки у пациента М. с ХМЛ

При гемобластозах возникают нарушения микроциркуляции в тканях глаз, что может привести к экссудативной отслойке нейрорепителителя сетчатки и вторичной дисфункции пигментного эпителия сетчатки (рис. 5) [11]. Считается, что патогенез подобного состояния связан с частичной окклюзией хориокапилляров и снижением хориоидальной микроциркуляции [12]. В результате ишемии и ухудшения ретиальной перфузии при пролиферативных заболеваниях крови могут появиться микроаневризмы, артериовенозные анастомозы, патологическая неоваскуляризация на сетчатке (рис. 6) [13].

Многие из найденных офтальмологических нарушений впоследствии могут приводить к значительному снижению или утрате зрения. Офтальмолог может быть первым, кто заподозрит по результатам обследования глаз пролиферативное заболевание крови, и своевременно направит пациента к гематологу. В свою очередь гематологи и терапевты должны быть осведомлены о том, что на фоне гемобластозов может происходить поражение органа зрения. Поэтому крайне важен междисциплинарный подход — взаимодействие гематологов с офтальмологами в ведении таких пациентов с целью ранней диагностики и лечения офтальмологических нарушений при данной группе заболеваний.

Безусловно, проблемы со зрением оказывают влияние на повседневное функционирование и возможность вести полноценную жизнь, снижая КЖ пациентов, а также могут негативно сказываться на психологическом комфорте и социальной адаптации больных. Начало нынешнего столетия ознаменовалось значительным ростом публикаций на тему изучения КЖ пациентов. Оценку качества жизни проводят для определения эффективности лечения больных, успешности мер профилактического и реабилитационного характера, для индивидуального мониторинга состояния пациентов. В настоящее время у больных с катарактой, глаукомой, ретинопатией и возрастной макулярной дегенерацией широко применяют опросник NEI-VFQ-25. Оценка КЖ стала значимой частью многих крупных исследований. Установлено, что при патологии органа зрения страдает КЖ в целом, происходит абсолютное снижение показателей по шкалам опросника [14, 15]. Определение уровня КЖ у пациентов с нарушением зрения является важным критерием социально-психологического исхода многих заболеваний, непосредственно связанных как со снижением зрения, так и исходом хронических заболеваний, когда нарушение глазных функций может протекать на фоне имеющегося соматического заболевания. Оценка КЖ позволяет дифференцированно определить влияние болезни на состояние больного с учетом как связанных, так и не связанных с заболеванием факторов.

По данным анкетирования обследованных нами пациентов, можно предположить, что снижение показателей КЖ может быть связано с симптомами основного хронического заболевания и проводимой терапией лекарственными препаратами, а также вследствие различных аметропий и других офтальмологических нарушений, выявленных при обследовании.

ВЫВОДЫ

Проведенный анализ показал, что на фоне ХМПЗ у 92,7% пациентов развиваются офтальмологические нарушения, а также достоверно изменяются такие показатели КЖ, как «общая оценка зрения», «глазная боль», «общее состояние здоровья» и «вождение автомобиля». Цель исследования достигнута в полном объеме, однако дальнейшая работа по изучению глазных проявлений данной группы заболеваний крови не завершена. Случаи поражения органа зрения при ХМПЗ и патогенез развития подобных состояний требуют дальнейшего углубленного изучения.

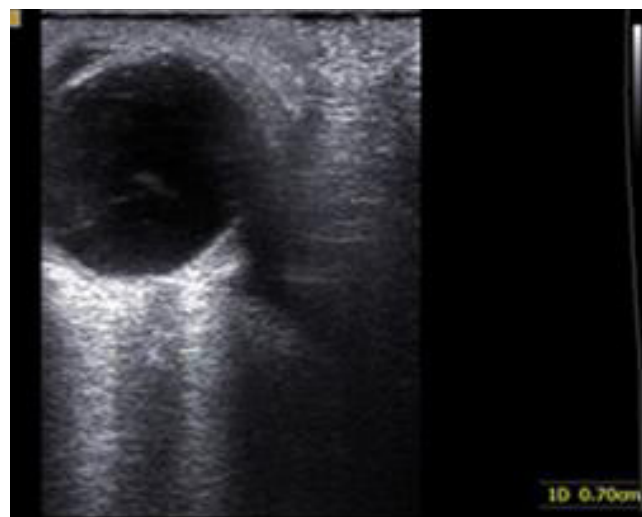


Рис. 4. Расширение периневрального пространства зрительного нерва у пациента М. с ХМПЗ (УЗИ глазного яблока и орбиты с доплерографией сосудов)

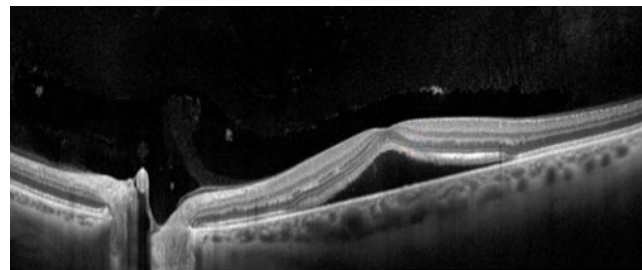


Рис. 5. Серозная отслойка нейрорепителителя сетчатки у пациентки С. с ИП (ОКТ макулярной области)

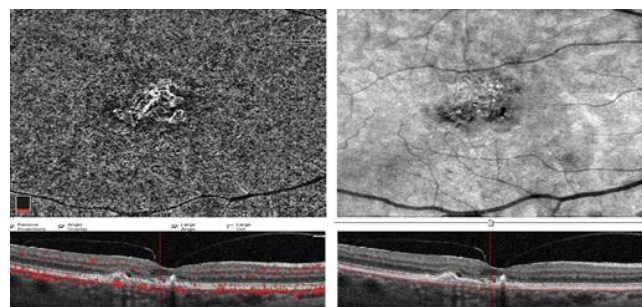


Рис. 6. Хориоидальная неоваскулярная мембрана макулярной области у пациентки Т. с ХМПЗ (ОКТ с ангиографией макулярной области)

Литература

1. Lacerda JF, Oliveira SN, Ferro JM. Chronic myeloproliferative diseases. *Handb Clin Neurol*. 2014; 120: 1073–81. DOI: 10.1016/B978-0-7020-4087-0.00072-3.
2. Румянцев Ю. В., Карачунский А. И. Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России и Белоруссии. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2007; 6 (4): 13.
3. Breccia M, Gentilini F, Cannella L, Latagliata R, Carmosino I, Frustaci A, Alimena G. Ocular side effects in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leuk Res*. 2008; 32 (7): 1022–5. DOI: 10.1016/j.leukres. 2007.10.016.
4. Wahab A, Rafae A, Mushtaq K, asood A, Ehsan H, Khakwani M, Khan A. Ocular Toxicity of Belantamab Mafodotin, an Oncological Perspective of Management in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *Front Oncol*. 2021; 11: 678634. DOI: 10.3389/fonc.2021.678634.
5. Руднева Л. Ф., Пономарева М. Н. Стратегия лечения глаз при гемобластозах. *Медицинская наука и образование Урала*. 2019; 20 (2): 205–8.
6. Чистякова Н. В., Шадричев Ф. Е., Кузнецова Т. И. Случай изолированного внутриглазного рецидива острого лимфобластного лейкоза. *Офтальмологические ведомости*. 2017; 10 (3): 74–84.
7. Dhasmana R, Prakash A, Gupta N, Verma SK. Ocular manifestations in leukemia and myeloproliferative disorders and their association with hematological parameters. *Ann Afr Med*. 2016; 15 (3): 97–103. DOI: 10.4103/1596-3519.188887.
8. Soman S, Kasturi N, Srinivasan R, Vinod KV. Ocular Manifestations in Leukemias and Their Correlation with Hematologic Parameters at a Tertiary Care Setting in South India. *Ophthalmol. Retina*. 2018; 2 (1): 17–23. DOI: 10.1016/j.oret.2017.05.009.
9. Гришина Е. Е., Мамонтов А. О. Офтальмологические проявления лейкоза. *Альманах клинической медицины*. 2016; 44 (5): 587–91.
10. Sharma PV, Ilyas O, Jobanputra Y, Casanova T, Kalidindi V, Santos N. Is it always cancer? A curious case of benign intracranial hypertension in chronic myeloid leukemia. *Intractable Rare Dis. Res*. 2018; 7 (3): 182–4. DOI: 10.5582/irdr.2018.01045.
11. Chinta S, Rani PK, Manusani U. Bilateral exudative retinal detachment as a presenting sign of acute lymphoblastic leukemia. *Middle East Afr J*. 2012; 19 (4): 410–2. DOI: 10.4103/0974-9233.102762.
12. Руднева Л. Ф., Василькова Т. Н., Петров И. М., Пономарева М. Н. Гемобластоzy. Особенности поражения глаз. Тюмень: Коновалов И. С., 2020; 90 с.
13. Mohamed SF, Qatani A, Nashwan A, Abdulla MA, Yassin MA. Ophthalmologic Manifestations as Initial Presentation of Patients with Chronic Myeloid Leukemia: Report of Two Cases. *Case Rep Oncol*. 2020; 13 (1): 7–11. DOI: 10.1159/000504928.
14. Игонина И. А. Основные методы оценки качества жизни офтальмологических больных. *Смоленский медицинский альманах*. 2017; 1: 152–6.
15. Габдрахманова А. Ф., Курбанов С. А. Клинико-функциональное значение показателей качества жизни при первичной открытоугольной глаукоме. *Национальный журнал глаукома*. 2015; 14 (4): 29–35.

References

1. Lacerda JF, Oliveira SN, Ferro JM. Chronic myeloproliferative diseases. *Handb Clin Neurol*. 2014; 120: 1073–81. DOI: 10.1016/B978-0-7020-4087-0.00072-3.
2. Rumyancheva YuV, Karachunskij AI. Optimizaciya terapii ostrogo limfoblastnogo lejkoza u detej v Rossii i Belorussii. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii*. 2007; 6 (4): 13. Russian.
3. Breccia M, Gentilini F, Cannella L, Latagliata R, Carmosino I, Frustaci A, Alimena G. Ocular side effects in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leuk Res*. 2008; 32 (7): 1022–5. DOI: 10.1016/j.leukres. 2007.10.016.
4. Wahab A, Rafae A, Mushtaq K, asood A, Ehsan H, Khakwani M, Khan A. Ocular Toxicity of Belantamab Mafodotin, an Oncological Perspective of Management in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *Front Oncol*. 2021; 11: 678634. DOI: 10.3389/fonc.2021.678634.
5. Rudneva LF, Ponomareva MN. Strategiya lecheniya glaz pri gemoblastozax. *Medicinskaya nauka i obrazovanie Urala*. 2019; 20 (2): 205–8. Russian.
6. Chistyakova NV, Shadrachev FE, Kuznecova TI. Sluchaj izolirovannogo vnutriglaznogo recidiva ostrogo limfoblastnogo lejkoza. *Oftal'mologicheskie vedomosti*. 2017; 10 (3): 74–84. Russian.
7. Dhasmana R, Prakash A, Gupta N, Verma SK. Ocular manifestations in leukemia and myeloproliferative disorders and their association with hematological parameters. *Ann Afr Med*. 2016; 15 (3): 97–103. DOI: 10.4103/1596-3519.188887.
8. Soman S, Kasturi N, Srinivasan R, Vinod KV. Ocular Manifestations in Leukemias and Their Correlation with Hematologic Parameters at a Tertiary Care Setting in South India. *Ophthalmol. Retina*. 2018; 2 (1): 17–23. DOI: 10.1016/j.oret.2017.05.009.
9. Grishina EE, Mamontov AO. Oftal'mologicheskie proyavleniya lejkoza. *Al'manax klinicheskoy mediciny*. 2016; 44 (5): 587–91. Russian.
10. Sharma PV, Ilyas O, Jobanputra Y, Casanova T, Kalidindi V, Santos N. Is it always cancer? A curious case of benign intracranial hypertension in chronic myeloid leukemia. *Intractable Rare Dis. Res*. 2018; 7 (3): 182–4. DOI: 10.5582/irdr.2018.01045.
11. Chinta S, Rani PK, Manusani U. Bilateral exudative retinal detachment as a presenting sign of acute lymphoblastic leukemia. *Middle East Afr J*. 2012; 19 (4): 410–2. DOI: 10.4103/0974-9233.102762.
12. Rudneva LF, Vasilkova TN, Petrov IM., Ponomareva MN. Gemoblastozy. Osobennosti porazheniya glaz. Tyumen': Konovalov IS, 2020; 90 s. Russian.
13. Mohamed SF, Qatani A, Nashwan A, Abdulla MA, Yassin MA. Ophthalmologic Manifestations as Initial Presentation of Patients with Chronic Myeloid Leukemia: Report of Two Cases. *Case Rep Oncol*. 2020; 13 (1): 7–11. DOI: 10.1159/000504928.
14. Igonina IA. Osnovnye metody ocenki kachestva zhizni oftal'mologicheskix bol'nyx. *Smolenskij medicinskij al'manax*. 2017; 1: 152–6. Russian.
15. Gabdrakhmanova AF, Kurbanov SA. Kliniko-funkcional'noe znachenie pokazatelej kachestva zhizni pri pervichnoj otkrytougol'noj glaukome. *Nacional'nyj zhurnal glaukoma*. 2015; 14 (4): 29–35. Russian.

ВЫРАЖЕННОСТЬ КОГНИТИВНЫХ И НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У КРЫС ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ КСЕНОНА 0,5 МАК

И. А. Крюков¹, А. В. Ершов^{2,3}, Р. А. Черпаков^{2,4}✉, О. А. Гребенчиков²

¹ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачева, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В. А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н. В. Склифосовского, Москва, Россия

У подавляющего числа пациентов, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения, выявляются остаточные явления, из них у 50% — когнитивные нарушения, ограничивающие самообслуживание в быту, трудовую деятельность и социальную адаптацию в целом и приводящие к инвалидности даже при отсутствии значительных двигательных нарушений. Целью исследования было подобрать наиболее эффективную продолжительность ингаляции ксенона с 0,5 МАК (максимальной альвеолярной концентрацией) для снижения выраженности неврологических и когнитивных нарушений при экспериментальном инсульте. На 70 крысах смоделирована фокальная ишемия-реперфузия по методу Лонга с последующей ингаляцией ксенона 0,5 МАК в течение 30, 60 или 120 мин. Неврологический дефицит оценивали с помощью серии из семи тестов «Постановка конечности на опору», когнитивные функции — тестом «Водный лабиринт Морриса». Экспозиция ксенона 0,5 МАК в течение 30 мин приводила к росту числа баллов в тесте «Постановка конечности на опору» на 40% ($p = 0,055$) и уменьшению латентного времени в тесте «Водный лабиринт Морриса» на 17,6% ($p = 0,08$) по сравнению с контрольной группой, экспозиция в течение 60 мин — в 2 раза ($p = 0,01$) и на 44,4% ($p = 0,04$), в течение 120 мин — тоже в 2 раза ($p = 0,01$) в обоих тестах соответственно. Сделан вывод, что ингаляция ксенона 0,5 МАК при экспозиции 30 мин не приводит к значительному улучшению состояния животных и их способности к обучению, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых различий. Экспозиция же ксенона в течение 60 мин значительно уменьшает неврологический и когнитивный дефицит в группе исследования, а увеличение времени экспозиции ксенона до 120 мин оказывает сопоставимый эффект.

Ключевые слова: ксенон, инсульт, неврологический дефицит, когнитивные нарушения

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» по теме научно-исследовательской работы «Анестетическая нейропротекция ксеноном и севофлураном при тяжелых повреждениях головного мозга. Клинико-экспериментальное исследование» (№ 0427-2019-0035).

Вклад авторов: И. А. Крюков — дизайн исследования, разработка концепции и формирование алгоритмов исследования; А. В. Ершов — экспериментальная часть работы, статистический анализ полученных данных; Р. А. Черпаков — редактирование статьи; О. А. Гребенчиков — редактирование, утверждение окончательного варианта статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (протокол № 4/21/2 от 29 сентября 2021 г.); проведено в соответствии с Европейской конвенцией ETS № 123 о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях (Страсбург) (1986 г. с приложением от 2006), Международным соглашением о гуманном обращении с животными (1986 г.), Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed. (Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, 2010 г.); Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes, 2010 г.; «Правилами надлежащей лабораторной практики» (2016 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Ростислав Александрович Черпаков
ул. Б. Черкизовская, д. 6, корп. 6, кв. 36, 107061, г. Москва, Россия

Статья получена: 21.05.2022 **Статья принята к печати:** 12.06.2022 **Опубликована онлайн:** 24.06.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.035

ALLEVIATION OF NEUROLOGICAL AND COGNITIVE IMPAIRMENTS IN RAT MODEL OF ISCHEMIC STROKE BY 0.5 MAC XENON EXPOSURE

Krukov IA¹, Ershov AV^{2,3}, Cherpakov RA^{2,4}✉, Grebenchikov OA²

¹ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

² Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, Moscow, Russia

³ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁴ Sklifosovsky Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russia

The majority of stroke patients have cognitive symptoms and about 50% of them live with neurological deficits that critically limit social adaptation capacities even in the absence of significant motor impairments. The aim of this study was to select the optimal length of 0.5 MAC xenon exposure in order to alleviate the neurological and cognitive impairments in experimental stroke. The focal ischemia-reperfusion injury was modeled in rats ($n = 70$) using Longa method. The intervention was immediately followed by inhalation of 0.5 MAC xenon for 30, 60 or 120 min. The neurological deficit was assessed using a 'Limb placement' seven-test battery and the cognitive functionalities were assessed by the Morris water maze test. A 30 min 0.5 MAC xenon exposure provided a 40% increase in the limb placement scores and a 17.6% decrease in the Morris water maze test latency compared with the control group ($p = 0.055$ and $p = 0.08$, respectively). With a longer 60 min exposure, the trends became significant, the scores improving 2-fold and by 44.4% compared with the control group ($p = 0.01$ and $p = 0.04$, respectively), whereas 120 min exposures afforded 2-fold improvements in both tests ($p = 0.01$). We conclude that, although 30 min post-stroke inhalations provide negligible benefits in terms of neurological status and learning capacity, prolonged exposure times of 60–120 min afford significant improvement in neurological and cognitive indicators and largely alleviate the deteriorating ischemic damage.

Keywords: xenon, stroke, neurological deficiency, cognitive impairment

Funding: the study was funded by the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation state budgetary institution of science as a part of research project "Anesthetic neuroprotection with xenon and sevoflurane in severe brain damage. Clinical and experimental study" (No. 0427-2019-0035).

Author contribution: Krukov IA — study design, concept development and research algorithm establishment; Ershov AV — experimental part, statistical analysis of the data; Cherpakov RA — manuscript writing and editing; Grebenchikov OA — scientific editing of the final version.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review Board at the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (Protocol № 4/21/2 of 29 September 2021) and conducted in compliance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS № 123, Strasbourg 18/03/1986, with the Appendix of 2006), Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th ed. (2010), Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes (2010) and the Good Laboratory Practice Guidelines (2016).

✉ **Correspondence should be addressed:** Rostislav A. Cherpakov
B. Cherkizovskaya, 6, corp. 6, k. 36, Moscow, 107061, Russia

Received: 21.05.2022 **Accepted:** 12.06.2022 **Published online:** 24.06.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.035

По данным Всемирной организации здравоохранения, 1/3 всех заболеваний в развитых странах составляют заболевания головного мозга, они же являются основной причиной инвалидности [1]. Кроме того, доля заболеваний головного мозга в общей структуре заболеваний и инвалидизации увеличивается за счет роста распространенности нейродегенеративной и цереброваскулярной патологии, а также факторов риска: заболеваемости сахарным диабетом, артериальной гипертензией, патологией почек, ухудшением экологической обстановки, общего старения населения, автомобильных травм и техногенных катастроф.

Первое место среди причин инвалидизации занимает инсульт. По разным данным, 40–60% пациентов, перенесших инсульт, становятся инвалидами, нуждающимися в медико-социальной поддержке на протяжении всей жизни, что наносит значительный социальный и экономический ущерб [2, 3]. У четверти из них выражены когнитивные нарушения в виде деменции, что значительно ухудшает качество жизни как самого пациента, так и членов его семьи. Только 15% пациентов возвращаются к трудовой деятельности и полноценному выполнению повседневных обязанностей. У 25% из них наблюдается выраженная деменция [4, 5].

В качестве постинсультных когнитивных расстройств рассматривают дефицит высшей психической деятельности, возникающий и прогрессирующий в течение года после заболевания. Нарушения, проявившиеся в течение острой фазы (первые три месяца), выявляются у 70% пациентов и расцениваются как ранние постинсультные когнитивные расстройства. Когнитивные нарушения могут быть как фокальными (афазия, апраксия), так и общими, к которым можно отнести нарушение ориентации во времени и пространстве, рассеянность и неспособность длительно удерживать внимание, трудность в подборе слов, повышенную забывчивость, снижение способности к переключению на разные виды деятельности, ослабление критичности, трудности при выполнении обычных действий, нарушение абстрактного мышления [2, 3, 6].

Повреждение головного мозга вследствие ишемического или геморрагического инсульта, а также вследствие остановки сердца или черепно-мозговой травмы инициирует каскад патофизиологических реакций, в основе которых лежит опосредованная рецепторами NMDA эксайтотоксичность, обуславливающая патогенез многих острых и хронических нейродегенеративных расстройств, вплоть до болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона, болезни Паркинсона [7].

Для психологической коррекции более 15 лет применяют инертный газ ксенон, являющийся антагонистом постсинаптических NMDA-рецепторов, располагающихся на мембране нейронов, глиоцитов, моноцитов, макрофагов и нейтрофилов [8, 9]. NMDA-рецепторы участвуют в формировании памяти и процессов обучения, выполняя ноцицептивную функцию, обуславливая острые и хронические неврологические заболевания, психические расстройства, реализацию патологического болевого синдрома. Эти рецепторы способствуют также гиперактивации нейронов под воздействием возбуждающих аминокислот и формированию зависимости от психоактивных веществ [10, 11]. Известно, что ксенон может оказывать антистрессорный эффект, снижать уровень тревожности в субнаркозных концентрациях. Применение ксенона в терапии пограничных психических расстройств приводит к редукции психопатологических и соматовегетативных нарушений [12].

Лечение постинсультных когнитивных нарушений — сложная задача, так как они имеют многофакторную природу и обусловлены как ишемическим повреждением вследствие непосредственного нарушения мозгового кровообращения, так и нарастанием тяжести когнитивных расстройств, существовавших до развития инсульта. В связи с этим актуально и патогенетическое, и симптоматическое лечение постинсультных когнитивных нарушений, в особенности, нейропротективная терапия [13, 14], однако единой доказательной базы для используемых препаратов не существует, и их эффективность изучают до сих пор. В последние годы благородным газам, в частности, ксенону, исследователи уделяют повышенное внимание в связи с накопленными свидетельствами нейропротективного эффекта [15–20], однако способы его применения и методы дозирования при различных заболеваниях находятся на стадии изучения, влияние на когнитивную сферу и восстановление неврологического статуса после ишемического повреждения головного мозга в результате инсульта мало изучено.

Цель исследования — подобрать наиболее эффективную продолжительность ингаляции 0,5 МАК для снижения выраженности неврологических и когнитивных нарушений при экспериментальном инсульте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

У 70 крыс-самцов массой 300–350 г, взятых из питомника (ООО «Кролинфо»; Россия), предварительно наркотизированных внутрибрюшинной инъекцией 12%-го раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг, моделировали фокальную ишемию в бассейне правой средней мозговой артерии по методу Лонга [21]. Летальность составила 14,3% (10 животных). Ложнооперированным животным ($n = 10$) проводили те же процедуры под анестезией хлоралгидратом, но без перекрытия кровотока, для исключения влияния наркоза и операционного доступа на результаты эксперимента. Среднее время проведения операции составляло 7–10 мин, после ее завершения крыс помещали в герметичную камеру, и в контрольной группе подавали кислородно-воздушную смесь (30% кислорода), а в группах исследования — ксенон 0,5 МАК (70% ксенона + 30% кислорода) в течение 30, 60 или 120 мин. До и после операции животные содержались в условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Неврологический дефицит оценивали на третий день после операции по функциональным нарушениям в передних и задних конечностях, противоположных поврежденному полушарию, выявленных с помощью серии из семи непрерывных тестов «Постановка конечности на опору», выполненных на установке «Staircase test» («НПК Открытая Наука»; Россия) [22]. Выполнение теста оценивали в 2 балла, выполнение с промедлением (более 2 с) и/или неполностью — 1 балл, невыполнение задания — 0 баллов.

Оценку сохранности когнитивных функций, таких как обучение и пространственная память, проводили с использованием теста «Водный лабиринт Морриса». Для теста использовали круглый бассейн диаметром 150 см и высотой 60 см, наполовину наполненный водой, в одном из секторов которого устанавливали платформу высотой 28 см [23, 24]. Обучение проводили с седьмого по 10-й день эксперимента, каждому животному предоставляли четыре попытки с разным стартом по 120 с для нахождения и запоминания места расположения платформы. Фиксировали латентный период нахождения платформы

в каждой попытке. Тестирование осуществляли на 14-й день после моделирования ишемии: животному в течение 60 с необходимо было определить место, где расположена платформа при старте с новой позиции. Фиксировали латентный период вхождения в сектор, где на этапе обучения находилась платформа. После завершения тестирования животных выводили из эксперимента введением повышенной дозы хлоралгидрата.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc.; США). Данные в таблице представлены как медиана (нижний квартиль; верхний квартиль). Различия показателей между группами оценивали при помощи U-критерия Манна-Уитни, критический уровень значимости составил $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Неврологический дефицит у ложнооперированных животных отсутствовал, в серии тестов «Постановка конечности на опору» все крысы набрали максимальное число баллов (14 баллов). В контрольной группе с экспозицией в течение 30 мин кислородно-воздушной смеси наблюдали выраженный неврологический дефицит, сумма баллов была на 64,3% ниже ($p = 0,005$) по сравнению с ложнооперированными животными. При экспозиции ксенона 0,5 МАК сумма баллов была выше на 40% ($p = 0,055$) по сравнению с контрольной группой (табл.), однако оставалась в 2 раза ниже ($p = 0,0001$) по сравнению с ложнооперированными животными, что свидетельствует о сохранении выраженного неврологического дефицита.

В контрольной группе после экспозиции в течение 60 мин кислородно-воздушной смеси тоже был выявлен выраженный неврологический дефицит; сумма баллов была на 57,1% ниже ($p = 0,004$) по сравнению с ложнооперированными животными. После экспозиции ксенона 0,5 МАК в течение 60 мин сумма баллов в 2 раза ($p = 0,01$) превышала аналогичный показатель контрольной группы, и оставалась лишь на 14,3% ниже ($p = 0,08$) по сравнению с ложнооперированными животными, что свидетельствует о минимальном неврологическом дефиците. Необходимо отметить, что сумма баллов после экспозиции 60 мин превышала аналогичный показатель, полученный после 30-минутной экспозиции, на 71,4% ($p = 0,0002$), что свидетельствует об большей эффективности часовой ингаляции ксенона 0,5 МАК по сравнению с получасовой.

В контрольной группе после экспозиции в течение 120 мин кислородно-воздушной смеси также сохранялся выраженный неврологический дефицит; сумма баллов

была на 57,1% ниже ($p = 0,004$) по сравнению с ложнооперированными животными и не отличалась от таковой после экспозиции воздушно-кислородной смеси в течение 60 мин. После экспозиции ксенона 0,5 МАК в течение 120 мин сумма баллов в 2 раза ($p = 0,01$) превышала аналогичный показатель контрольной группы, оставалась на 14,3% ниже ($p = 0,08$) по сравнению с ложнооперированными животными, и не отличалась от аналогичного показателя у животных после экспозиции ксенона 0,5 МАК в течение 60 мин.

По результатам тестирования в «Водном лабиринте Морриса» латентный период нахождения платформы у ложнооперированных животных составил 8 с (7; 9). В контрольной группе с экспозицией в течение 30 мин кислородно-воздушной смеси латентный период превышал в 2,1 раз ($p = 0,007$) показатель у ложнооперированных животных, что свидетельствует о значительном ухудшении способности к обучению и пространственному распознаванию у животных на фоне перенесенного ишемического повреждения мозга. При экспозиции ксенона 0,5 МАК латентный период нахождения платформы сократился на 17,6% ($p = 0,08$) по сравнению с контрольной группой, однако на 75% ($p = 0,001$) превышал аналогичный показатель у ложнооперированных животных.

В контрольной группе с экспозицией в течение 60 мин кислородно-воздушной смеси латентный период также превышал в 2,25 раз ($p = 0,006$) показатель у ложнооперированных животных. При экспозиции ксенона 0,5 МАК в течение 60 мин латентный период нахождения платформы сократился на 44,4% ($p = 0,04$) по сравнению с контрольной группой, и на 25% ($p = 0,57$) превышал аналогичный показатель у ложнооперированных животных.

В контрольной группе с экспозицией в течение 120 мин кислородно-воздушной смеси латентный период также превышал в 2,25 раз ($p = 0,005$) показатель у ложнооперированных животных. При экспозиции ксенона 0,5 МАК в течение 120 мин латентный период нахождения платформы сократился в 2 раза ($p = 0,01$) по сравнению с контрольной группой, и всего на 12,5% ($p = 0,74$) превышал аналогичный показатель у ложнооперированных животных.

Таким образом, полученные данные показали, что моделирование ишемического повреждения по методу Лонга у крыс вызывает значительный неврологический и когнитивный дефицит. Ингаляция ксенона 0,5 МАК при экспозиции 30 мин не приводит к значительному улучшению состояния животных и их способности к обучению, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых различий. Экспозиция ксенона в течение 60 мин значимо уменьшала неврологический и когнитивный дефицит в группе исследования, а увеличение времени экспозиции ксенона до 120 мин оказывало сопоставимый эффект.

Таблица. Оценка неврологического дефицита и когнитивных функций при экспозиции ксенона 0,5 МАК различной продолжительности (Me (LQ; HQ))

Параметр	Группа животных						
	ЛО (n = 10)	Время экспозиции 30 мин		Время экспозиции 60 мин		Время экспозиции 120 мин	
		Контроль (n = 10)	Ксенон (n = 10)	Контроль (n = 10)	Ксенон (n = 10)	Контроль (n = 10)	Ксенон (n = 10)
Неврологический дефицит, баллы	14	5 (3; 7) [^]	7 (5; 10) [^]	6 (3; 8) [^]	12 (8;13) [*]	6 (3; 7) [^]	12 (8;13) [*]
Латентный период нахождения платформы, с	8 (7; 9)	17 (14; 19) [^]	14 (8; 20) [^]	18 (15; 20) [^]	10 (5; 15) [*]	18 (16; 20) [^]	9 (5; 13) [*]

Примечание: ЛО — ложнооперированные животные; [^] — наличие статистически значимых различий по сравнению с группой ложнооперированных животных ($p < 0,05$; критерий Манна-Уитни); ^{*} — наличие статистически значимых различий по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$; критерий Манна-Уитни).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У 2/3 пациентов, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения, выявляя остаточные явления, зачастую обуславливающие первичную инвалидность, из них у 50% — когнитивные нарушения, которые ограничивают самообслуживание в быту, трудовую деятельность и социальную адаптацию в целом, даже при отсутствии значительных двигательных нарушений. В связи с увеличением количества инсультов у лиц молодого и среднего трудоспособного возраста за последние 20 лет на 25% все это приобретает особое значение [1, 2]. Частота постинсультной деменции колеблется, по данным разных исследователей, от 7,4 до 41,3% и с течением времени прогрессирует [2]. Так, по некоторым данным, когнитивные нарушения были выявлены у 68% пациентов в остром периоде ишемического инсульта (1–3 сутки), а через месяц — у 83%, в том числе у 52% в виде умеренных когнитивных расстройств, а у 30% — в виде деменции [3]. Аналогичные результаты получили и другие авторы: через четыре года наблюдений когнитивные нарушения выявлялись у 84% [25].

Когнитивные нарушения при ишемическом поражении головного мозга требуют активной медикаментозной и немедикаментозной терапии, поэтому так важен поиск препаратов и лечебных методик, позволяющих уменьшить инвалидизацию после перенесенного инсульта. Использование ксенона, обладающего нейротрофическими и нейропротективными свойствами, в качестве компонента такой терапии представляет особый интерес. По данным литературы, ксенон обладает положительным психотропным эффектом, проявляющимся в улучшении внимания и повышении работоспособности, снижении тревожности и улучшении сна [8, 26–29].

Применение субнаркологических доз ксенона курсом 5–10 процедур способствовало снижению тревожности у пациентов с различными формами тревожно-фобического расстройства без органической патологии головного мозга [10]. Пр продемонстрирован положительный эффект ингаляций кислородно-ксеноновой смеси (5–10% Xe, 95–90% O₂) на фоне стабилизации показателей системной гемодинамики у пациентов с паркинсонизмом и возрастной атрофией коры головного мозга [30].

При назначении курса ингаляций кислородно-ксеноновой смеси (50% Xe, 50% O₂) пациентам с проявлениями острой энцефалопатии на фоне алкогольной, наркотической и смешанной форм зависимости удалось уменьшить выраженность психических и соматоневрологических нарушений. Пациенты отмечали исчезновение тревоги, подъем настроения, прилив бодрости, потребность в общении, расширение объема используемой в речи лексики. Улучшалось запоминание, показатели кратковременной памяти и переключения внимания, увеличивался темп мышления, способность к самообслуживанию. Таким образом, ксеноновая терапия оказалась предпочтительнее стандартной терапии как для психосоматической коррекции, так и для улучшения когнитивных и интеллектуальных возможностей пациентов [31].

Единой методики применения ксенона при различных заболеваниях и патологических состояниях не существует.

Ксенон применяют в экспериментальных работах в виде ксеноновых липосом [32]. Авторы установили положительный эффект от внутривенного введения липосом после моделирования фокальной ишемии мозга у крыс: снижение неврологического дефицита в тесте размещения передней конечности на 3-й и 5-й дни, а также увеличение времени плавания по сравнению с животными, перенесшими инсульт без последующей ксеноновой терапии, что авторы трактуют как уменьшение депрессивного состояния. В большинстве же исследований ксенон применяют в виде ингаляций различной продолжительности. Так, был показан нейропротекторный эффект ксенона в дозе 1 МАК при экспозиции в течение 6 ч и в течение 3 ч при ингаляции смеси из 50% ксенона, 25% аргона, 25% кислорода после моделирования черепно-мозговой травмы у крыс [33, 34]. На модели остановки сердца у свиней с последующей сердечно-легочной реанимацией было установлено улучшение когнитивных и неврологических функций на 1–3-й дни в группе животных, получавших 70%-й ксенон в течение 1 или 5 ч [35]. Показано, что ингаляция 70% ксенона уменьшала общий объем инфаркта и улучшала неврологический исход через 24 ч после транзиторной фокальной ишемии головного мозга у мышей по сравнению с 70% азота, тогда как 35% ксенона оказывали промежуточный эффект [36]. Нам представляется важным изучить влияние субанестетических доз ксенона (0,5 МАК) при коротких экспозициях на выраженность неврологических нарушений и когнитивные функции при ишемическом поражении головного мозга в результате окклюзии средней мозговой артерии, подобные исследования в доступной нам литературе не обнаружены. Мы оценивали лечение ксеноном 0,5 МАК, потому что эта концентрация позволила бы дать дополнительный кислород при необходимости, как это часто бывает у пациентов с острым ишемическим повреждением головного мозга. Ингаляции начинали сразу после моделирования инсульта в бассейне средней мозговой артерии и давали в течение относительно короткого времени (30, 60 и 120 мин) у спонтанно дышащих животных, моделируя сценарий, при котором лечение могло быть начато бригадой скорой медицинской помощи и продолжено в больнице.

ВЫВОДЫ

В нашем исследовании установлено, что ингаляция ксенона 0,5 МАК при кратковременной экспозиции 30 мин не приводит к значительному улучшению состояния животных и их способности к обучению, т. е. не обладает достаточным терапевтическим эффектом. Экспозиция же ксенона в течение 60 мин уменьшала неврологический и когнитивный дефицит в группе исследования в среднем в 2 раза, а увеличение времени экспозиции ксенона до 120 мин оказывало сопоставимый эффект. Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о высокой эффективности терапии ксеноном 0,5 МАК в постинсультном периоде поражения головного мозга при назначении в виде 1–2-часовых ингаляций в максимально короткие сроки после инсульта, что перспективно для использования в коррекции неврологических и когнитивных постинсультных нарушений и требует дальнейшего изучения в клинической практике.

Литература

- Bejot Y, Bailly H, Durier J, Giroud M. Epidemiology of stroke in Europe and trends for the 21st century. *Presse Medicale*. 2016; 45 (12): 391–8. DOI: 10.1016/j.lpm.2016.10.003.
- Преображенская И. С. Когнитивные нарушения после инсульта: распространенность, причины и подходы к терапии. *Эффективная фармакотерапия*. 2013; 45: 50–57.
- Парфенов В. А., Вербицкая С. В. Постинсультные когнитивные нарушения. *Медицинский совет*. 2018; 18: 11–15. DOI: 10.21518/2079-701X-2018-18-10-15.
- Пирадов М. А., Крылов В. В., Белкина А. А., Петриков С. С. Инсульты. В книге: Гельфанд Б. Р., Заболотский И. Б., редакторы. *Интенсивная терапия. Национальное руководство*. 2-е изд., Москва: ГЭО-ТАР-Медиа, 2017; с. 288–309.
- Шевченко Е. В., Рамазанов Г. Р., Петриков С. С. Причины головокружения у больных с подозрением на острое нарушение мозгового кровообращения. *Журнал им. Н. В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь»*. 2018; 7 (3): 217–21. DOI: 10.23934/2223-9022-2018-7-3-217-221.
- Douglas-Escobar M, Weiss MD. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA Pediatr*. 2015; 169 (4): 397–403. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2014.3269. PMID: 25685948.
- Wong TP, Howland JG, Wang YT. NMDA Receptors and Disease+ C464. *Encyclopedia of Neuroscience*. 2009: 1177–82. DOI: 10.1016/b978-008045046-9.01223-7.
- Бубеев Ю. А., Котровская Т. И., Кальманов А. С. Ксенон-кислородная газовая ингаляция для коррекции негативных последствий стресса. В сб.: *Ксенон и инертные газы в медицине: Материалы конференции анестезиологов-реаниматологов медицинских учреждений МО РФ*. М.: ГВКГ им. Н. Н. Бурденко, 2008; с. 4–9.
- Goto T. Xenon anesthesia — results from human studies. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology*. 2000; 9: 129–31. Available from: https://academic.naver.com/article.naver?doc_id=194615041.
- Герасимова Ю. Ю., Ермакова М. А. Нейропротективные эффекты субнаркологических и наркотических концентраций медицинского ксенона. *Вестник совета молодых ученых и специалистов челябинской области*. 2017; 3 (18). Доступно по ссылке: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_30672509_99990060.pdf.
- Burov NE, Makeev GN, Potapov VN. Applying xenon technologies in Russia. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology*. 2000; 9: 132–3. Available from: https://www.researchgate.net/publication/297793098_Applying_xenon_technologies_in_Russia.
- de Sousa SL, Dickinson R, Lieb WR, Franks NP. Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon. *Anesthesiology*. 2000; 92 (4): 1055–66. DOI: 10.1097/00000542-200004000-00024. PMID: 10754626.
- Кузовлев А. Н., Шпичко А. И., Рыжков И. А., Гребенчиков О. А., Шабанов А. К., Хусаинов Ш. Ж., Цоколаева З. И., Лобанов А. В. Влияние ксенона на фосфорилирование киназы гликогенинсинтазы-3β и антиоксидантные ферменты в мозге крыс. *Журнал им. Н. В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь»*. 2020; 9 (4): 564–572. DOI: 10.23934/2223-9022-2020-9-4-564-572.
- Гребенчиков О. А., Молчанов И. В., Шпичко А. И., Евсеев А. К., Шабанов А. К., Хусаинов Ш. Ж., Петриков С. С. Нейропротективные свойства ксенона по данным экспериментальных исследований. *Журнал им. Н. В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь»*. 2020; 9 (1): 85–95. DOI: 10.23934/2223-9022-2020-9-1-85-95.
- Zhang J, Liu W, Bi M, Xu J, Yang H, Zhang Y. Noble gases therapy in cardiocerebrovascular diseases: the novel stars? *Front Cardiovasc Med*. 2022; 9: 802783. DOI: 10.3389/fcvm.2022.802783.
- Tetorou K, Sisa C, Iqbal A, Dhillon K, Hristova M. Current Therapies for Neonatal Hypoxic-Ischaemic and Infection-Sensitized Hypoxic-Ischaemic Brain Damage. *Front Synaptic Neurosci*. 2021; 13: 709301. DOI: 10.3389/fnsyn.2021.709301.
- Zhao C-S, Li H, Wan Z, Chen G. Potential application value of xenon in stroke treatment. *Med Gas Res*. 2018; 8 (3): 116–20. DOI: 10.4103/2045-9912.241077.
- Roehl A, Rolf R, Mark C. Update of the organoprotective properties of xenon and argon: from bench to bedside. *ICMx*. 2020; 11. DOI: 10.1186/s40635-020-0294-6.
- Koziaikova M, Harris K, Edge CJ, Franks NP, White IL, Dickinson R. Noble gas neuroprotection: xenon and argon protect against hypoxic-ischaemic injury in rat hippocampus in vitro via distinct mechanisms. *Br J Anaesth*. 2019; 123 (5): 601–9. DOI: 10.1016/j.bja.2019.07.010.
- Maze M, Laitio T. Neuroprotective Properties of Xenon. *Mol Neurobiol*. 2020; 57: 118–24. DOI: 10.1007/s12035-019-01761-z.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20 (1): 84–91. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.
- Силачёв Д. Н., Шубина М. И., Янкаускас С. С., Мкртчян В. П., Манских В. Н., Гуляев М. В., Зоров Д. Б. Оценка сенсомоторного дефицита в отдаленном периоде после ишемии/гипоксии головного мозга неонатальных крыс. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2013; 63 (3): 405–16. DOI: 10.7868/S0044467713030131.
- Игтышев А. М., Горина Я. В., Лопатина О. Л., Комлева Ю. К., Черных А. И., Белова О. А., Салмина А. Б. Сравнение тестов «Восьмирукавный радиальный лабиринт» и «Водный лабиринт Морриса» при оценке пространственной памяти у экспериментальных животных в ходе нейроповеденческого тестирования. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2017; 2 (2): 62–69. DOI: 10.23946/2500-0764-2017-2-2-62-69.
- Нотова С. В., Казакова Т. В., Маршинская О. В. Современные методы и оборудование для оценки поведения лабораторных животных. *Животноводство и кормопроизводство*. 2018; 101 (1): 106–15.
- Mahon S, Parmar P, Barker-Collo S. Determinants, prevalence, and trajectory of long-term post-stroke cognitive impairment. Results from a 4-year follow-up of the ARCOS-IV study. *Neuroepidemiology*. 2017; 49 (3–4): 129–34. DOI: 10.1159/000484606 PMID: 29145207.
- Васильев С. В., Владимиров С. А. Возможности клинического использования субнаркологических доз ксенона. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2012; 6. Доступно по ссылке: <https://docplayer.com/68328413-Vozmozhnosti-klinicheskogo-ispolzovaniya-subnarkoticheskikh-doz-ksenona.html>.
- Игошина Т. В. Коррекция связанных со стрессом невротических расстройств методом ингаляции субнаркологических доз ксенона в условиях санатория. *Кремлевская медицина*. 2013; 4: 37–42. <http://kremlin-medicine.ru/index.php/km/article/view/10/9>
- Богомолов И. С., Павлова Р. А., Федоров С. С., Хабибулин Р. Ф. Влияние ксенона на когнитивную сферу терапевтических пациентов с сопутствующей энцефалопатией различного генеза. *Материалы третьей конференции*. 2012; с. 107–12.
- Корнетов Н. А., Шписман М. Н., Наумов С. А. Применение лечебного ксенонового наркоза в комплексной терапии абстинентного синдрома при опиатной наркомании. М.: Медицина, 2001.
- Перов А. Ю., Овчинников Б. М. Внедрение в широкую медицинскую практику технологии лечения смесями благородных газов с кислородом. *Биржа интеллектуальной собственности*. 2010; 9 (5): 35–36.
- Давлетов Л. А. Применение ксенона в комплексной терапии психических и соматоневрологических расстройств в структуре острой энцефалопатии у пациентов с зависимостью от психоактивных веществ: диссертация на звание канд. мед. наук. Москва, 2007: 27.
- Dandekar MP, Yin X, Peng T, Devaraj S, Morales R, McPherson D, et al. Repetitive xenon treatment improves post-stroke sensorimotor and neuropsychiatric dysfunction. *Journal of Affective Disorders*. 2022; 301: 315–30. DOI: 10.1016/j.jad.2022.01.025.
- Campos-Pires R, Hirnet T, Valeo F, Ong BE, Radyushkin K,

- Aldhoun J, et al. Xenon improves long-term cognitive function, reduces neuronal loss and chronic neuroinflammation, and improves survival after traumatic brain injury in mice. *Br J Anaesth*. 2019; 123 (1): 60–73. DOI: 10.1016/j.bja.2019.02.032.
34. Campos-Pires R, Ongradito H, Ujvari E, Karimi S, Valeo F, Aldhoun J, et al. Xenon treatment after severe traumatic brain injury improves locomotor outcome, reduces acute neuronal loss and enhances early beneficial neuroinflammation: a randomized, blinded, controlled animal study. *Crit Care*. 2020; 24 (1): 667. DOI: 10.1186/s13054-020-03373-9.
 35. Fries M, Nolte KW, Coburn M, Rex S, Timper A, Kottmann K, et al. Xenon reduces neurohistopathological damage and improves the early neurological deficit after cardiac arrest in pigs. *Crit Care Med*. 2008; 36: 2420–6. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181802874.
 36. Homi HM, Yokoo N, Ma D, Warner DS, Franks NP, Maze M, et al. The neuroprotective effect of xenon administration during transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Anesthesiology*. 2003; 99 (4): 876–81. DOI: 10.1097/0000542-200310000-00020.
- ## References
1. Bejot Y, Bailly H, Durier J, Giroud M. Epidemiology of stroke in Europe and trends for the 21st century. *Presse Medicale*. 2016; 45 (12): 391–8. DOI: 10.1016/j.lpm.2016.10.003.
 2. Preobrazhenskaya IS. Kognitivnye narusheniya posle insulta: rasprostranennost', prichiny i podxody k terapii. *Ehffektivnaya farmakoterapiya*. 2013; 45: 50–57. Russian.
 3. Parfenov VA, Verbickaya SV. Postinsul'tnye kognitivnye narusheniya. *Medicinskij sovet*. 2018; 18: 11–15. DOI: 10.21518/2079-701X-2018-18-10-15. Russian.
 4. Piradov MA, Krylov VV, Belkin AA, Petrikov SS. Insulty. V knige: Gelfand BR, Zabolotskiy IB, redaktory. *Intensivnaya terapiya. Nacional'noe rukovodstvo*. 2-e izd., Moskva: GEHO-TAR-Media, 2017; c. 288–309. Russian.
 5. Shevchenko EV, Ramazanov GR, Petrikov SS. Prichiny golovokruzheniya u bol'nyx s podozreniem na ostroe narushenie mozgovogo krovoobrashcheniya. *Zhurnal im. N. V. Sklifosovskogo «Neotlozhnaya medicinskaya pomoshh'»*. 2018; 7 (3): 217–21. Russian.
 6. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA Pediatr*. 2015; 169 (4): 397–403. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2014.3269. PMID: 25685948.
 7. Wong TP, Howland JG, Wang YT. NMDA Receptors and Disease+C464. *Encyclopedia of Neuroscience*. 2009: 1177–82. DOI: 10.1016/b978-008045046-9.01223-7.
 8. Bubeev YuA, Kotrovskaya TI, Kalmanov AS. Ksenon-kislородnaya gazovaya ingalyatsiya dlya korrektsii negativnyx posledstvij stressa. V sb.: Ksenon i inertnye gazy v medicine: Materialy konferencii anesteziologov-reanimatologov medicinskix uchrezhdenij MO RF. M.: GVKG im. N. N. Burdenko, 2008; c. 4–9. Russian.
 9. Goto T. Xenon anesthesia — results from human studies. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology*. 2000; 9: 129–31. Available from: https://academic.naver.com/article.naver?doc_id=194615041.
 10. Gerasimova YuYu, Ermakova MA. Nejroprotektivnye ehffekty subnarkoticheskix i narkoticheskix koncentracij medicinskogo ksenona. *Vestnik soвета molodyx uchenyx i specialistov chelyabinskoy oblasti*. 2017; 3 (18). Dostupno po ssylke: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_30672509_99990060.pdf. Russian.
 11. Burov NE, Makeev GN, Potapov VN. Applying xenon technologies in Russia. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology*. 2000; 9: 132–3. Available from: https://www.researchgate.net/publication/297793098_Applying_xenon_technologies_in_Russian.
 12. de Sousa SL, Dickinson R, Lieb WR, Franks NP. Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon. *Anesthesiology*. 2000; 92 (4): 1055–66. DOI: 10.1097/0000542-200004000-00024. PMID: 10754626.
 13. Kuzovlev AN, Shpichko AI, Ryzhkov IA, Grebenchikov OA, Shabanov AK, Xusainov ShZh, Cokolaeva ZI, Lobanov AV. Vliyanie ksenona na fosforilirovanie kinazy glikogensintazy-3β i antioksidantnye fermenty v mozge krys. *Zhurnal im. N. V. Sklifosovskogo «Neotlozhnaya medicinskaya pomoshh'»*. 2020; 9 (4): 564–572. DOI: 10.23934/2223-9022-2020-9-4-564-572. Russian.
 14. Grebenchikov OA, Molchanov IV, Shpichko AI, Evseev AK, Shabanov AK, Xusainov ShZh, Petrikov SS. Nejroprotektivnye svojstva ksenona po dannym ehksperimental'nyx issledovanij. *Zhurnal im. N. V. Sklifosovskogo «Neotlozhnaya medicinskaya pomoshh'»*. 2020; 9 (1): 85–95. DOI: 10.23934/2223-9022-2020-9-1-85-95. Russian.
 15. Zhang J, Liu W, Bi M, Xu J, Yang H, Zhang Y. Noble gases therapy in cardiocerebrovascular diseases: the novel stars? *Front Cardiovasc Med*. 2022; 9: 802783. DOI: 10.3389/fcvm.2022.802783.
 16. Tetorou K, Sisa C, Iqbal A, Dhillon K, Hristova M. Current Therapies for Neonatal Hypoxic-Ischaemic and Infection-Sensitised Hypoxic-Ischaemic Brain Damage. *Front Synaptic Neurosci*. 2021; 13: 709301. DOI: 10.3389/fnsyn.2021.709301.
 17. Zhao C-S, Li H, Wan Z, Chen G. Potential application value of xenon in stroke treatment. *Med Gas Res*. 2018; 8 (3): 116–20. DOI: 10.4103/2045-9912.241077.
 18. Roehl A, Rolf R, Mark C. Update of the organoprotective properties of xenon and argon: from bench to bedside. *ICMx*. 2020; 11. DOI: 10.1186/s40635-020-0294-6.
 19. Koziakova M, Harris K, Edge CJ, Franks NP, White IL, Dickinson R. Noble gas neuroprotection: xenon and argon protect against hypoxic-ischaemic injury in rat hippocampus in vitro via distinct mechanisms. *Br J Anaesth*. 2019; 123 (5): 601–9. DOI: 10.1016/j.bja.2019.07.010.
 20. Maze M, Laitio T. Neuroprotective Properties of Xenon. *Mol Neurobiol*. 2020; 57: 118–24. DOI: 10.1007/s12035-019-01761-z.
 21. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20 (1): 84–91. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.
 22. Silachyov DN, Shubina MI, Yankauskas SS, Mkrtchyan VP, Manskix VN, Gulyaev MV, Zorov DB. Ocenka sensomotornogo deficita v otdalennom periode posle ishemii/gipoksii golovnogo mozga neonatal'nyx krys. *Zhurnal vyshej nervnoj deyatel'nosti*. 2013; 63 (3): 405–16. DOI: 10.7868/S0044467713030131. Russian.
 23. Iptyshev AM, Gorina YaV, Lopatina OL, Komleva YuK, Chernyx AI, Belova OA, et al. Sravnenie testov «Vos'mirukavnyj radial'nyj labirint» i «Vodnyj labirint Morrisa» pri ocenke prostranstvennoj pamyati u ehksperimental'nyx zhivotnyx v xode nejropovedencheskogo testirovaniya. *Fundamental'naya i klinicheskaya medicina*. 2017; 2 (2): 62–69. DOI: 10.23946/2500-0764-2017-2-2-62-69. Russian. 2017; 2 (2): 62–69. DOI: 10.23946/2500-0764-2017-2-2-62-69.
 24. Notova SV, Kazakova TV, Marshinskaya OV. Sovremennye metody i oborudovanie dlya ocenki povedeniya laboratornyx zhivotnyx. *Zhivotnovodstvo i kormoproizvodstvo*. 2018; 101 (1): 106–15. Russian.
 25. Mahon S, Parmar P, Barker-Collo S. Determinants, prevalence, and trajectory of long-term post-stroke cognitive impairment. Results from a 4-year follow-up of the ARCOS-IV study. *Neuroepidemiology*. 2017; 49 (3–4): 129–34. DOI: 10.1159/000484606 PMID: 29145207.
 26. Vasilev SV, Vladimirov SA. Vozmozhnosti klinicheskogo ispol'zovaniya subnarkoticheskix doz ksenona. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2012; 6. Dostupno po ssylke: <https://docplayer.com/68328413-Vozmozhnosti-klinicheskogo-ispolzovaniya-subnarkoticheskix-doz-ksenona.html>. Russian.
 27. Igoshina TV. Korrekciya svyazannyx so stressom nevroticheskix rasstrojstv metodom ingalyatsii subnarkoticheskix doz ksenona v usloviyax sanatoriya. *Kremlevskaya medicina*. 2013; 4: 37–42. <http://kremlin-medicine.ru/index.php/km/article/view/10/9>. Russian.
 28. Bogomolov IS, Pavlova RA, Fedorov SS, Xabibulin RF. Vliyanie ksenona na kognitivnyuyu sferu terapevticheskix pacientov s soputstvuyushhej ehncefalopatiej razlichnogo geneza. *Materialy tret'ej konferencii*. 2012; s. 107–12. Russian.

29. Kornetov NA, Shpisman MN, Naumov SA. Primenenie lechebnogo ksenonovogo narkoza v kompleksnoj terapii abstinentnogo sindroma pri opiatnoj narkomanii. M.: Medicina, 2001. Russian.
30. Perov AY, Ovchinnikov BM. Vnedrenie v shirokuyu medicinskuyu praktiku tekhnologii lecheniya smesymi blagorodnykh gazov s kislorodom. Birzha intellektual'noj sobstvennosti. 2010; 9 (5): 35–36. Russian.
31. Davletov LA. Primenenie ksenona v kompleksnoj terapii psicheskix i somatonevrologicheskix rasstrojstv v strukture ostroj ehnocefalopatii u pacientov s zavisimost'yu ot psixoaktivnyx veshhestv: dissertaciya na zvanie kand. med. nauk. Moskva, 2007: 27. Russian.
32. Dandekar MP, Yin X, Peng T, Devaraj S, Morales R, McPherson D, et al. Repetitive xenon treatment improves post-stroke sensorimotor and neuropsychiatric dysfunction Journal of Affective Disorders 2022; 301: 315–30. DOI: 10.1016/j.jad.2022.01.025.
33. Campos-Pires R, Hirnet T, Valeo F, Ong BE, Radyushkin K, Aldhoun J, et al. Xenon improves long-term cognitive function, reduces neuronal loss and chronic neuroinflammation, and improves survival after traumatic brain injury in mice. Br J Anaesth. 2019; 123 (1): 60–73. DOI: 10.1016/j.bja.2019.02.032.
34. Campos-Pires R, Ongradito H, Ujvari E, Karimi S, Valeo F, Aldhoun J, et al. Xenon treatment after severe traumatic brain injury improves locomotor outcome, reduces acute neuronal loss and enhances early beneficial neuroinflammation: a randomized, blinded, controlled animal study. Crit Care. 2020; 24 (1): 667. DOI: 10.1186/s13054-020-03373-9.
35. Fries M, Nolte KW, Coburn M, Rex S, Timper A, Kottmann K, et al. Xenon reduces neurohistopathological damage and improves the early neurological deficit after cardiac arrest in pigs. Crit Care Med. 2008; 36: 2420–6. DOI: 10.1097 /CCM.0b013e3181802874.
36. Homi HM, Yokoo N, Ma D, Warner DS, Franks NP, Maze M, et al. The neuroprotective effect of xenon administration during transient middle cerebral artery occlusion in mice. Anesthesiology. 2003; 99 (4): 876–81. DOI: 10.1097/00000542-200310000-00020.