

# 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 Гейдебрект, к. б. н., Надежда Тихомирова

**ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР** Евгений Лукьянов

**ПЕРЕВОДЧИКИ** Надежда Тихомирова, Вячеслав Витюк

**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. Боженов, 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](mailto:editor@vestnikrgmu.ru)

**СОТРУДНИЧЕСТВО** [manager@vestnikrgmu.ru](mailto: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 (h<sup>2</sup>) 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.2022-06

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](http://www.creativecommons.org)



Подписано в печать 31.12.2022  
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии PrintFormula  
[www.print-formula.ru](http://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, PhD, Nadezda Tikhomirova

**TECHNICAL EDITOR** Evgeny Lukyanov

**TRANSLATORS** Nadezda Tikhomirova, Vyacheslav Vityuk

**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)  
Kzyshkowska 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](mailto:editor@vestnikrgmu.ru)

**COLLABORATION** [manager@vestnikrgmu.ru](mailto: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.2022-06

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](http://www.creativecommons.org)



Approved for print 31.12.2022  
Circulation: 100 copies. Printed by PrintFormula  
[www.print-formula.ru](http://www.print-formula.ru)

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

5

**Роль генетических маркеров лекарственной устойчивости *mef* и *ermB* при подборе доноров фекальной микробиоты**

А. В. Господарик, Л. А. Улаханова, С. С. Есиев, Е. В. Полякова, Я. Д. Шанский, Ю. А. Беспятых

**The role of *mef* and *ermB* drug resistance genetic markers in the selection of fecal microbiota donors**

Gospodaryk AV, Ulakhanova LA, Esiev SS, Polyakova EV, Shansky YD, Bespyatykh JA

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

13

**Изменения микробиоты кишечника у больных ювенильным идиопатическим артритом**

М. В. Поросюк, Д. Д. Клементьев, Н. А. Ходов, Л. Н. Гуменюк, Э. С. Эсатова, Е. В. Середа, К. С. Четверухина-Малова, Е. В. Сарчук, С. В. Иванов

**Gut microbiota alterations in patients with juvenile idiopathic arthritis**

Porosyuk MV, Klementiev DD, Hodov NA, Gumenyuk LN, Esatova ES, Sereda EV, Chetveruhina-Malova KS, Sarchuk EV, Ivanov SV

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

20

**Мутационные основы формирования устойчивости к меропенему у *Pseudomonas aeruginosa***

И. В. Чеботарь, Ю. А. Бочарова, А. В. Чаплин, Т. А. Савинова, Ю. А. Василиадис, Н. А. Маянский

**Mutational basis of meropenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa***

Chebatar IV, Bocharova YuA, Chaplin AV, Savinova TA, Vasiliadis YuA, Mayansky NA

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

26

**Определение прогностически значимой сигнатуры ДНК-метилирования у пациенток с различными типами рака молочной железы**

А. И. Калинин, В. О. Сигин, М. В. Немцова, В. В. Стрельников

**Identification of prognostically significant DNA methylation signatures in patients with various breast cancer types**

Kalinkin AI, Sigin VO, Nemtsova MV, Strelnikov VV

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

36

**Полиморфизмы rs17713054 и rs1800629 генов *LZTFL1* и *TNF* ассоциированы с тяжестью течения COVID-19**

А. А. Траспов, М. М. Минашкин, С. В. Поляков, А. Г. Комаров, И. А. Штинова, Г. И. Спешилов, И. А. Карбышев, Н. В. Позднякова, М. А. Годков

**The rs17713054 and rs1800629 polymorphisms of genes *LZTFL1* and *TNF* are associated with COVID-19 severity**

Trasпов AA, Minashkin MM, Poyarkov SV, Komarov AG, Shtinova IA, Speshilov GI, Karbyshev IA, Pozdnyakova NV, Godkov MA

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

43

**Трансгенные мыши для изучения киназа-независимых механизмов действия циклин-зависимых киназ CDK8/19**

Н. И. Ставская, Л. А. Ильчук, Ю. Д. Окюлова, М. В. Кубекина, Е. А. Варламова, Ю. Ю. Силаева, А. В. Брутер

**Transgenic mice for study of the CDK8/19 cyclin-dependent kinase kinase-independent mechanisms of action**

Stavskaya NI, Ilchuk LA, Okulova YuD, Kubekina MV, Varlamova EA, Silaeva YuYu, Bruter AV

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

48

**Нокаут мутантного *TP53* в клетках линии HaCaT усиливает их миграционную активность**

П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин, А. Л. Русанов, Н. Г. Лузгина

**Knockout of mutant *TP53* in the HaCaT cells enhances their migration activity**

Kozhin PM, Romashin DD, Rusanov AL, Luzgina NG

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

55

**Особенности профиля аминокислот в моноцитах при раке молочной железы**

А. В. Новоселова, М. Н. Юшина, М. Р. Патышева, Е. А. Простакишина, О. Д. Брагина, Е. Ю. Гарбуков, Ю. Г. Кжышкowska

**Peculiarities of amino acid profile in monocytes in breast cancer**

Novoselova AV, Yushina MN, Patysheva MR, Prostakishina EA, Bragina OD, Garbukov EY, Kzhyshkowska JG

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

63

**Роль кластерина в прогнозировании развития ранней и поздней преэклампсии в первом триместре беременности**

А. В. Тимофеева, И. С. Федоров, А. М. Тарасова, К. А. Горина, Ю. В. Сухова, В. А. Гусар, Т. Ю. Иванец

**Role of clusterin in predicting development of early- and late-onset preeclampsia in the first trimester of pregnancy**

Timofeeva AV, Fedorov IS, Tarasova AM, Gorina KA, Suhova YuV, Gusar VA, Ivanets TYu

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

76

**Взаимосвязь факторов риска микроэмболии с возрастом в восстановительном периоде ишемического инсульта**

Е. В. Орлова, А. Б. Бердалин, В. Г. Лелюк

**Correlation of microembolism risk factors with age in the ischemic stroke recovery period**

Orlova EV, Berdalin AB, Lelyuk VG

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

84

**Нейтрофильные и моноцитарные экстраклеточные ловушки в диагностике постковидного синдрома**

Ж. М. Салмаси, Г. В. Порядин, М. И. Панина, В. Н. Ларина, А. А. Рыжих, Е. А. Стоделова, А. Н. Казимирский

**Neutrophil and monocyte extracellular traps in the diagnosis of post-covid syndrome**

Salmasi JM, Poryadin GV, Panina MI, Larina VN, Ryzhikh AA, Stodelova EA, Kazimirskii AN

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

89

**Алгоритм сегментации ОКТ-изображений макулы для анализа пациентов с возрастной макулярной дегенерацией**

Р. Р. Ибрагимова, И. И. Гильманов, Е. А. Лопухова, И. А. Лакман, А. Р. Билялов, Т. Р. Мухаммадеев, Р. В. Кутлугаров, Г. М. Идрисова

**Algorithm of segmentation of OCT macular images to analyze the results in patients with age-related macular degeneration**

Ibragimova RR, Gilmanov II, Lopukhova EA, Lakman IA, Bilyalov AR, Mukhamadeev TR, Kutluyarov RV, Idrisova GM

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

97

**Обоснование использования несъемных ретейнеров на основании анализа размеров коронок резцов и клыков**

М. А. Постников, А. В. Бутвиловский, А. А. М. Алшарифи, А. В. Мадатян, И. С. Копецкий, Д. А. Еремин

**Justification of use of fixed retainers based on the analysis of size of the incisor and canine crowns**

Postnikov MA, Butvilovsky AV, Alsharifi AAM, Madatyan AV, Kopetskiy IS, Eremin DA

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

105

**Подход к разработке пролекарства на основе Амикумацина А**

В. И. Шмыгарев, Ю. А. Прокопенко, С. С. Терехов, М. Ю. Захарова, М. А. Дубинный, И. В. Смирнов, И. В. Ямпольский, А. С. Царькова

**Amicoumacin-based prodrug development approach**

Shmygarev VI, Prokopenko YuA, Terekhov SS, Zakharova MYu, Dubinnyi MA, Smirnov IV, Yampolsky IV, Tsarkova AS

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

112

**Эффективность фавипиравира и молнупиравира против новых вариантов SARS-CoV-2 в системах *in vitro* и *in vivo***

А. Э. Синявин, Л. И. Руссу, Д. В. Васина, Е. В. Шидловская, Н. А. Кузнецова, В. А. Гушчин, А. Л. Гинцбург

**Efficacy of Favipiravir and Molnupiravir against novel SARS-CoV-2 variants *in vitro* and *in vivo***

Siniavin AE, Russu LI, Vasina DV, Shidlovskaya EV, Kuznetsova NA, Gushchin VA, Gintsburg AL

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

118

**Прямое масс-спектрометрическое профилирование менингиом: интраоперационный мониторинг на основе онкометаболитов**

Д. С. Бормотов, М. А. Шамраева, А. А. Кузин, Е. В. Шамарина, В. А. Елиферов, С. В. Силкин, Е. В. Жданова, С. И. Пеков, И. А. Попов

**Ambient MS profiling of meningiomas: intraoperative oncometabolite-based monitoring**

Bormotov DS, Shamraeva MA, Kuzin AA, Shamarina EV, Elifirov VA, Silkin SV, Zhdanova EV, Pekov SI, Popov IA

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

127

**Влияние различных доз мРНК-ЛНЧ-вакцин на нейровоспаление у BALB/c мышей**

А. С. Киршина, А. А. Казакова, Е. С. Колосова, Е. А. Имашева, О. О. Васильева, О. В. Заборова, И. М. Теренин, А. Р. Муслимов, В. В. Решетников

**Effects of various mRNA-LNP vaccine doses on neuroinflammation in BALB/c mice**

Kirshina AS, Kazakova AA, Kolosova ES, Imasheva EA, Vasileva OO, Zaborova OV, Terenin IM, Muslimov AR, Reshetnikov VV

## МНЕНИЕ

135

**Стратегии дизайна лекарственных препаратов для лечения коронавирусной инфекции**

С. С. Терехов, В. И. Шмыгарев, К. В. Пуртов, И. В. Смирнов, И. В. Ямпольский, А. С. Царькова

**Drug design strategies for the treatment of coronavirus infection**

Terekhov SS, Shmygarev VI, Purto KV, Smirnov IV, Yampolsky IV, Tsarkova AS



## РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ *MEF* И *ERMB* ПРИ ПОДБОРЕ ДОНОРОВ ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ

А. В. Господарик<sup>1</sup> ✉, Л. А. Улаханова<sup>1</sup>, С. С. Есиев<sup>1</sup>, Е. В. Полякова<sup>1</sup>, Я. Д. Шанский<sup>1</sup>, Ю. А. Беспятых<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

<sup>2</sup> Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва, Россия

<sup>3</sup> Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья имени Н. А. Семашко, Москва, Россия

Трансплантацию фекальной микробиоты (ТФМ) назначают в качестве терапии для лечения различных патологий желудочно-кишечного тракта. Подбор донора является одним из наиболее важных и значимых этапов для ТФМ. Особое внимание в последнее время уделяют проблеме наличия генов устойчивости к разным группам антибиотиков в биоматериале. Целью исследования было провести анализ встречаемости генетических маркеров лекарственной устойчивости *mef* и *ermB* среди разных возрастных групп населения, включая младенцев на грудном вскармливании, а также определить микробиологический состав дистальной части кишечника у потенциально здоровых добровольцев доноров ТФМ. Всего было проанализировано 52 образца биологического материала (46 образцов кала и шесть — грудного молока) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Ген устойчивости к макролидам (*mef*) среди разных возрастных групп был выявлен в 97,8% образцах кала, ген устойчивости к макролидам, линкозамидам, стрептограмину (*ermB*) — в 93,5%. В отдельно выделенной группе «мать – дитя» ген *mef* обнаружен во всех образцах грудного молока и кала. Ген *ermB* в этой группе подтвержден в трех из шести образцов грудного молока и четырех из шести образцов кала младенцев. В результате детекции генетических детерминант *mef* и *ermB* не только среди взрослого населения, но и у младенцев, было выдвинуто предположение, что использование трансплантата (кала), содержащего данные гены допустимо для ТФМ. Анализ микробиологического состава кала 23 здоровых добровольцев — потенциальных доноров ТФМ, показал очень низкий процент соответствия (8,7%) нормам микробиоты дистальной части кишечника.

**Ключевые слова:** ТФМ, гены резистентности, *mef*, *ermB*, доноры фекальной микробиоты, ПЦР

**Финансирование:** Грант АНО «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении» (№ 2412-31).

**Вклад авторов:** А. В. Господарик — подбор участников исследования, анализ биологических образцов методом ПЦР, анализ литературы, написание статьи; Л. А. Улаханова — анализ литературы, написание статьи, бактериологический посев кала, бактериологический анализ; С. С. Есиев — анализ литературы, выделение нуклеиновых кислот из биологических образцов; Е. В. Полякова — практическая часть бактериологического анализа, выделение нуклеиновых кислот из биологических образцов; Я. Д. Шанский — статистическая обработка данных; Ю. А. Беспятых — концепция исследования, консультирование, написание и редактирование статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (протокол номер 2022/05/31 от 31 мая 2022 г.). Добровольное информированное согласие подписано всеми участниками исследования.

✉ **Для корреспонденции:** Алина Владимировна Господарик  
Красногорское шоссе, д. 15, г. Одинцово, Московская обл., 143007, Россия; alina.gospodarik@rcpcm.org

**Статья получена:** 20.10.2022 **Статья принята к печати:** 25.11.2022 **Опубликована онлайн:** 16.12.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.059

## THE ROLE OF *MEF* AND *ERMB* DRUG RESISTANCE GENETIC MARKERS IN THE SELECTION OF FECAL MICROBIOTA DONORS

Gospodaryk AV<sup>1</sup> ✉, Ulakhanova LA<sup>1</sup>, Esiev SS<sup>1</sup>, Polyakova EV<sup>1</sup>, Shansky YD<sup>1</sup>, Bespyatykh JA<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Lopukhin Federal Research and Clinical Center Of Physical-Chemical Medicine under the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russia

Fecal microbiota transplantation (FMT) is prescribed to treat various gastrointestinal pathologies. One of the most important and significant stages of FMT is selection of the donor. In recent years, special attention has been paid to checking the biomaterial for genes marking resistance to various groups of antibiotics. This study aimed to analyze the occurrence of *mef* and *ermB* drug resistance genetic markers in population of various age groups, including breastfed infants, and to determine microbiological composition of the flora of distal part of the intestine of potentially healthy volunteering FMT donors. A total of 52 biological samples (46 stool samples and 6 breast milk samples) were analyzed by real-time polymerase chain reaction. The macrolides resistance gene (*mef*) was detected in 97.8% of stool samples (different age groups), the gene marking resistance to macrolides, lincosamides, streptogramin (*ermB*) — in 93.5%. In the isolated "mother-child" group, the *mef* gene was found in all samples of breast milk and feces. The *ermB* gene in this group was found in 3 out of 6 breast milk samples and 4 out of 6 infant stool samples. Since the *mef* and *ermB* genetic determinants were identified not only among in adults but also in infants, it was suggested that transplant material (feces) containing these genes can be used for FMT. The analysis of microbiological composition of stool samples from 23 healthy volunteers (potential FMT donors) revealed that it rarely (in 8.7% of cases only) corresponds to what is considered to be a normal microbiota of the intestine's distal part.

**Keywords:** FMT, antibiotic resistance gene, *mef*, *ermB*, fecal microbiota donor, PCR

**Funding:** Grant of ANO Moscow Center for Innovative Technologies in Healthcare (#2412-31).

**Author contribution:** Gospodaryk AV — selection of study participants, PCR analysis of biological samples, literature analysis, article authoring; Ulakhanova LA — literature analysis, article authoring, fecal culture, bacteriological analysis; Esiev SS — literature analysis, isolation of nucleic acids from biological samples; Polyakova EV — practical part of the bacteriological analysis, isolation of nucleic acids from biological samples; Shansky YD — statistical data processing; Bespyatykh JA — study concept, consulting, article authoring and editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Federal Research and Clinical Center Of Physical-Chemical Medicine under the Federal Medical Biological Agency of Russia (Minutes #2022/05/31 of May 31, 2022). All study participants signed the voluntary informed consent form.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alina V. Gospodaryk  
Krasnogorskoe shosse, 15, Odintsovo, Moscow region, 143007, Russia; alina.gospodarik@rcpcm.org

**Received:** 20.10.2022 **Accepted:** 25.11.2022 **Published online:** 16.12.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.059

На сегодняшний день трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) становится все более востребованным подходом к коррекции дисбиоза микробиоты, обусловленного различными патологическими состояниями. ТФМ представляет собой процедуру введения взвеси фекалий здорового донора в кишечный тракт реципиента с целью терапии или профилактики ряда заболеваний посредством изменения микробиома реципиента [1–3]. На основании большого числа рандомизированных исследований доказана высокая эффективность применения метода при рефрактерных и рецидивирующих формах кишечных инфекций, вызванных *Clostridium difficile* [1, 4, 5]. С 2013 г. процедура ТФМ официально одобрена Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (Food & Drug Administration, FDA) [6].

Выбор и скрининг доноров является одним из наиболее важных аспектов ТФМ, так как обеспечивает ее безопасность для пациента. Отбор доноров самый трудоемкий и ресурсозатратный и состоит из нескольких этапов: анкетирования (для сбора анамнеза заболеваний донора) и лабораторного обследования (предотвращает возможную передачу патогенов реципиенту). Лабораторное обследование донора включает в себя: базовые гематологические и биохимические исследования крови, анализ на гепатиты В и С, вирус иммунодефицита человека, сифилис, общий анализ мочи, копрограмму, анализ кала на скрытую кровь, простейшие и яйца гельминтов, бактериальный посев кала, анализ кала методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на патогенную кишечную флору и выявление генетических маркеров лекарственной устойчивости (наличие генов резистентности) [7, 8].

В последнее время наблюдается активное распространение микроорганизмов, несущих гены устойчивости к антибиотикам различных групп [9]. Обусловлено это, в частности, повсеместным повышением частоты применения антимикробных препаратов широкого спектра действия. Давление, оказываемое антибиотиками на микробную популяцию, приводит к мутации или трансформации генетического материала, обеспечивающего выработку новых механизмов адаптации к изменяющимся условиям [10]. Помимо этого, существует механизм передачи генов устойчивости от одной бактерии к другой, происходящий с помощью мобильных элементов (плазмиды, транспозоны и интегроны). Распространение генов устойчивости к антибиотикам происходит в результате техногенного развития разных секторов промышленности не только среди микроорганизмов, непосредственно взаимодействующих с человеком, но и в природе. Устойчивые бактерии были выделены из глубоких подземных траншей, в сточных водах, поверхностных и грунтовых водах, отложениях и почвах [11]. Они присутствуют также в организмах, живущих в местах, относительно не затронутых человеческой цивилизацией, таких как Антарктида и Арктика [12]. Распространение генов резистентности к антибиотикам возрастает с каждым годом. Так, в одном из исследований, длившемся с 2011 по 2015 г. были изучены частота и механизмы устойчивости к макролидам штаммов *Streptococcus pyogenes*, выделенных из микрофлоры человека. Результаты показали возросшую резистентность патогена к макролидам на 6,8–12,6% от общего числа исследуемых штаммов [13].

При подборе доноров для трансплантации микробиоты особый интерес вызывают гены, обуславливающие устойчивость бактерий родов *Streptococcus* и

*Staphylococcus* к макролидам, линкозамидам и стрептограммам. К данной группе относятся ген *mef* (*macrolide efflux*), продуктами которого являются эффлюксные белки, и ген *ermB* (*erythromycin ribosome methylation*), кодирующий 23S рРНК-метилазу, которая модифицирует молекулы мишени антибактериальных препаратов (АБП) [14, 15]. В другом исследовании отмечено широкое распространение генетических детерминант *mefA* и *ermB*, где оба гена резистентности были детектированы во всех образцах кишечной микробиоты больных хронической обструктивной болезнью легких (не применявших антибиотики минимум три месяца) как метагеномным методом, так и методом ПЦР в реальном времени [16, 17]. Гены резистентности в больших количествах были также обнаружены в образцах фекалий и даже меконии новорожденных детей [18].

Частое распространение данных генов среди потенциальных доноров для ТФМ вызывает проблему отбора подходящих индивидов для предоставления здоровой микробиоты.

Целью данной работы было провести анализ встречаемости генетических маркеров лекарственной устойчивости *mef* и *ermB* среди различных возрастных групп населения, а также определить микробиологический состав дистальной части кишечника у потенциальных доноров микробиоты.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Сбор образцов

Первичный отбор доноров проводили на основании анкетирования и согласно разработанному алгоритму [7]. Критерии включения: любой пол; возраст 18–55 лет, не принимавших антибактериальные препараты с лечебной целью от года и более. Образцы кала в данной группе исследуемых отбирали для определения состава микрофлоры, обнаружения патогенных микроорганизмов и анализа наличия генов резистентности. Критерии исключения: наличие в анамнезе заболеваний, связанных с нарушением состава кишечной микробиоты, хронических заболеваний и/или прием АБП. Согласно полученным данным из 57 обследованных добровольцев в исследование включены 23 здоровых добровольца, потенциальных донора фекальной микробиоты. Остальные добровольцы исключены из дальнейшего анализа ввиду отклонений от нормы показателей анализа крови.

Дополнительно в исследование включена группа «мать–дитя». Методом случайной выборки на основании информированного согласия биологический материал был получен от следующих категорий участников исследования: а) младенцы до 1 года, находящиеся на грудном вскармливании и никогда не принимавшие АБП; б) младенцы до 1 года на искусственном вскармливании, никогда не принимавшие АБП; в) дети 1–3 лет, никогда не принимавшие АБП; г) дети 3–7 лет, не принимавшие АБП больше года. В группу «мать–дитя» вошли шесть пар (кормящая мать/ребенок на грудном вскармливании), у которых были отобраны образцы кала (матери и младенца) и грудного молока.

Всего в исследование включено 52 образца биологического материала, из них 46 образцов кала и шесть образцов грудного молока. Среди образцов кала ( $n = 46$ ) 29 получено от взрослого населения, девять — от младенцев (2–11 месяцев), шесть детей находилось

Таблица 1. Метод бактериологического посева кала

Разведение	Группа идентифицируемых микроорганизмов	Питательная среда	Количество вносимой суспензии, мл	Время культивирования, ч	Оценка результатов
2	3	4	5	6	7
10 <sup>-8</sup>	<i>Bifidobacterium</i>	Блаурокк	1	72	Окраска по Граму, микроскопирование
10 <sup>-7</sup>	<i>Lactobacillus</i>	MPC-2			
10 <sup>-5</sup>	<i>Clostridium</i>	Железо-сульфитный агар	0.1	72	Выделение сероводорода (окраска среды в черный цвет), газообразование
	Гемолитические виды бактерий	Кровяной агар		20–22	Вид гемолиза: α, β, γ
10 <sup>-3</sup>	Энтеробактерии	Эндо			Учет бактерий по ферментации лактозы: + розовые колонии и питательная среда; — прозрачные колонии, цвет среды не изменяется
	Патогенные грибы	Сабура		48	Хромогенный агар, определяют по цвету колоний
	<i>Staphylococcus</i>	Желточно-солевой агар			Рост колоний, окраска среды в желтый цвет — усвоение маннита, лецитиназная активность
	<i>Enterococcus</i>	Молочно-ингибиторная среда			Учет бактерий по гидролизу эскулина — окраска колоний в темно-коричневый или черный цвет
10 <sup>-1</sup>	Патогенные энтеро-бактерии	XLD-агар		20–22	<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> spp. прозрачные, у сальмонелл — бесцветные с черным центром, <i>E. coli</i> — непрозрачные желтые с желтой зоной вокруг, <i>Proteus mirabilis</i> — желтые с черным центром
		SS-агар			<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> spp. прозрачные, у сальмонелл — бесцветные с черным центром, цвет среды — желтый; <i>E. coli</i> — малиновые, цвет среды — розовый, <i>Proteus mirabilis</i> — бурые с темным центром

на грудном вскармливании и трое — на искусственном; четыре образца — дети 1–3 лет; четыре образца — дети 3–7 лет.

Забор кала и грудного молока осуществляли в индивидуальный стерильный пластиковый контейнер. Образец весом 10–20 г (кал) и 10–20 мл (молоко) не подвергали заморозке, а как можно скорее отправляли в термоконтейнере для исследования либо хранили не более 8 ч при температуре 4 °С до момента его передачи.

#### Бактериологический посев кала

Посев проводили согласно нормативным документам [19]. Образец нативного образца кала массой 1 г гомогенизировали в 9 мл физиологического раствора (10<sup>-1</sup>), оставляли при комнатной температуре на 10–15 мин. Полученную суспензию высевали на плотные питательные среды для выявления патогенных энтеробактерий (SS- и XLD-агар (HiMedia Laboratories; Индия) и селенитовый бульон (Биокомпас-С; Россия) для выделения патогенных кишечных палочек. Из исходного разведения (10<sup>-1</sup>) готовили ряд последующих до 10<sup>-8</sup>.

Из приготовленных разведений делали посеvy на питательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов (на полужидкие питательные среды суспензию вносили в количестве 1 мл, на плотные — 0,1 мл, растирали стерильным шпателем по поверхности среды):

– разведение 10<sup>-8</sup> — бифидобактерии на полужидкую питательную среду Блаурокк (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия);

– разведение 10<sup>-7</sup> — лактобактерии на полужидкую питательную среду MPC-2 (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия) и бифидобактерии на среду Блаурокк (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия);

– разведение 10<sup>-5</sup> — клостридии, посев производили глубинным методом на железосульфитный агар («Биокомпас-С»; Россия), в количестве 1 мл; грамотрицательные энтеробактерии — среда Эндо (HiMedia Laboratories; Индия); гемолитические виды бактерий — кровяной агар (HiMedia Laboratories; Индия).

– разведение 10<sup>-3</sup> высевали на среду Эндо («Биокомпас-С»; Россия); для выявления патогенных грибов — среду Сабура («Биотехновация»; Россия); стафилококков — желточно-солевой агар (HiMedia Laboratories; Индия); энтерококков — молочно-ингибиторную среду («Биокомпас-С»; Россия) (табл.1).

Оценку бактериологического анализа проводили:

– через 20–22 ч на средах Эндо, кровяной агар, SS- и XLD-агар;

– через 48 ч на средах Сабура, желточно-солевой агар и молочно-ингибиторной;

– через 72 ч на средах Блаурокк, MPC-2, железосульфитный агар.

На средах Эндо подсчитывали число и процент лактозонегативных (бесцветных) колоний по отношению

Таблица 2. Бактериологическое исследование образцов кала потенциально здоровых добровольцев

№ п/п	Микрофлора	Норма, КОЕ/г	Число добровольцев, человек		p
			В пределах нормы	Отклонение от нормы	
1	<i>Bifidobacterium spp</i>	10 <sup>8</sup> и выше	13	10	0,678
2	<i>Lactobacillus spp</i>	10 <sup>6</sup> –10 <sup>7</sup>	12	11	0,835
3	Общее количество энтеробактерий	10 <sup>7</sup> –10 <sup>8</sup>	12	11	0,835
4	<i>Escherichia spp</i>	10 <sup>7</sup> –10 <sup>8</sup>	12	11	0,835
5	<i>Enterococcus spp</i>	10 <sup>6</sup> –10 <sup>7</sup>	4	19	0,004
6	Условно-патогенные энтеробактерии: <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Citrobacter amalonaticus</i> . лактозонегативная <i>Escherichia coli</i>	< 10 <sup>4</sup>	8	15	0,211
7	Патогенные микроорганизмы семейства кишечных	Не должно быть	23	0	< 0,001
8	<i>Staphylococcus</i>	≤ 10 <sup>4</sup> / не должно быть	9	14	0,404
	<i>S. aureus</i>	≤ 10 <sup>4</sup> / не должно быть	21	2	< 0,001
9	<i>Candida spp</i>	≤ 10 <sup>4</sup>	23	0	< 0,001
10	Неферментирующие грамотрицательные бактерии в т.ч. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	≤ 10 <sup>4</sup>	19	4	0,004
11	Сульфитредуцирующие анаэробы рода <i>Clostridium</i>	≤ 10 <sup>6</sup>	12	11	0.835

ко всему числу выросших колоний. Колонии со слабовыраженными ферментативными свойствами (слабое разложение лактозы — розовые колонии) подсчитывали по отношению к общему числу колоний кишечной палочки. Согласно имеющимся рекомендациям, родовой состав лактозонегативных энтеробактерий, не относящихся к патогенным бактериям семейства кишечных, можно не детализировать, а ограничиться определением на среде Эндо общей суммы лактозонегативных колоний.

#### Экстракция ДНК из биологического материала

Экстракцию ДНК из биологического материала (кал, грудное молоко) выполняли с использованием набора «ДНК-СОРБЕНТ» («Литех»; Россия) согласно протоколу производителя. Выделение ДНК из грудного молока выполняли по схеме выделения ДНК из слюны, ликвора, синовиальной жидкости. До проведения ПЦР выделенную ДНК хранили при температуре –20 °С.

#### Анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости

Анализ проводили с использованием моноплексного набора «РЕЗИСТОМ.Meф» (выявление *mef*-генов резистентности *Streptococcus spp.* к макролидам) и «РЕЗИСТОМ. ErmB» (выявление *erm*-генов резистентности *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.* к макролидам, линкозамидам и стрептомицину В) формата ФЛУОРОПОЛ-РВ («Литех»; Россия) методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories; США). Всего было протестировано 52 образца ДНК, выделенной из биологического материала (кала и молока). Для контроля

качества выделения ДНК, а также предотвращения возникновения ложноотрицательных результатов в наборе использовали внутренний экзогенный контроль (детектируемый по каналу HEX), который вносится в исследуемые образцы на этапе экстракции ДНК. ПЦР проводили в следующем режиме: 80 °С — 2 мин, 95 °С — 1 мин 30 с, затем 40 циклов: 95 °С — 15 с, 60 °С — 30 с, 72 °С — 40 с.

#### Статистический анализ

Статистическую обработку выполняли с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc.; США). Значимость различий наблюдаемых частот генов АБР в группах оценивали по критерию  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йейтса. Значимость различий частот для бактериологических показателей оценивали по критерию Мак-Немара. Различие считали статистически значимым при значениях  $p < 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно данным анкетирования и результатам клинических исследований (общий и биохимический анализ крови) из 57 обследованных добровольцев для дальнейшего исследования включены 23 человека — потенциальных донора фекальной микробиоты.

Для установления вероятного минимального возраста формирования носительства и путей передачи генов резистентности к макролидам (*mef* и *ermB*) сформирована группа «мать–дитя» (6 человек). Из данной группы в исследование включено 12 образцов кала и 6 образцов грудного молока.

Таблица 3. Распространение генов устойчивости *mef* и *ermB* в кале среди разных возрастных групп населения

Гены	Группа «мать–дитя»		Дети на искусственном вскармливании	Дети 1–3 лет	Дети 3–7 лет	Взрослые
	кал младенца	кал матери				
<i>mef</i>	6/6	6/6	3/3	4/4	3/4	23/23
<i>ermB</i>	4/6	6/6	2/3	4/4	4/4	23/23

Примечание: \* — численно отражено отношение количества образцов, в которых был выявлен ген, к общему количеству образцов в данной группе.



Таблица 4. Распространение генов устойчивости *mefA* и *ermB* в группе «мать-дитя»

Гены	Мать-дитя		
	Грудное молоко	Кал младенца	Кал матери
<i>mef</i>	6/6	6/6	6/6
<i>ermB</i>	3/6	4/6	6/6

Примечание: \* — численно отражено соотношение количества образцов, в которых был выявлен ген, к общему количеству образцов в данной группе.

### Бактериологический анализ

В ходе работы была проведена предварительная оценка качественного и количественного бактериологического состава образцов кала потенциально здоровых добровольцев ( $n = 23$ ). Результаты бактериологического посева соответствовали нормативным документам [20] и представлены в табл. 2.

Содержание видов облигатной микрофлоры, таких как *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, находится в норме у 52,2% исследуемых; *Enterococcus* — у 8,7%. Условно-патогенные бактерии факультативной микрофлоры не превышают нормы у 34,8% добровольцев и представлены видами *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter gergoviae*, лактозонегативная *Escherichia coli*.

Таким образом, анализ бактериологического посева показал, что соответствие нормам по всем показателям только 8,7% добровольцев, что составляет лишь четыре человека из 23 обследованных.

### Молекулярно-генетический анализ

Проведенный анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости к макролидам показал, что все 23 добровольца донора имеют положительный результат на оба гена (*mef* и *ermB*).

Поэтому для установления возможного возрастного периода появления данных генов, связи их наличия непосредственно с приемом АБП и путей передачи была сформирована выборка добровольцев «мать-дитя» и детей разных возрастных групп. Анализ генов резистентности *mef* и *ermB* проводили не только на образцах кала, но и дополнительно в образцах грудного молока. В табл. 3 представлены данные по наличию генов устойчивости в кале у всех добровольцев ( $n = 46$ ) разных возрастных групп.

Согласно полученным данным при анализе образцов кала *mef*-ген устойчивости к макролидам был выявлен в 45/46 (97,8%) образцах (табл. 3 и 4). Данный ген отсутствовал только в одном исследуемом образце, кале ребенка 7 лет. Наличие *ermB*-гена устойчивости к макролидам, линкозамидам, стрептограмину было подтверждено в 43/46 (93,5%) образцах (табл. 3 и 4). Ген *ermB* не детектирован в образцах кала трех младенцев, находящихся на грудном и искусственном вскармливании.

Наличие одновременно генов устойчивости *mef* и *ermB* выявлено в 44/52 образцах (84,6%).

Статистический анализ частот обнаружения генов *mef* и *ermB* не показал значимых различий между возрастными группами ( $p = 0,258$ ).

В группе «мать-дитя», где ребенок находится на грудном вскармливании (табл. 4), генетические детерминанты (ген *mef*) обнаружены во всех образцах грудного молока матери и кала младенцев. Наличие гена *ermB* подтверждено для трех из шести образцов грудного

молока и четырех из шести образцов кала младенцев. Стоит отметить, что из трех младенцев, получающих грудное молоко, не содержащее ген *ermB*, в образцах кала одного данный ген тем не менее выявлен. При изучении совместного распределения генов устойчивости *mef* и *ermB* в группе «кормящая мать-ребенок на грудном вскармливании» не выявлено отсутствие значимых различий между подгруппами ( $p = 0,423$ ).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отбор доноров для проведения трансплантации фекальной микробиоты является одним из самых сложных и важных этапов терапии, что обусловлено необходимостью исключить или свести к минимуму нежелательные последствия трансплантации для реципиента. Отдельное внимание стоит уделять резистентным бактериям, которые при трансплантации могут спровоцировать появление устойчивых клонов среди микрофлоры реципиента [21]. В то же время отрицательный результат бактериологического анализа не может гарантировать отсутствие самих генов резистентности.

Определение бактериологического состава кала позволяет выявить фекальную микрофлору, отражающую микробный состав дистальных отделов кишечника, и определить качественное и количественное содержание микробиоты. Изменение соотношения отдельных видов микроорганизмов позволяет диагностировать дисбиотические нарушения пищеварительного тракта.

Толстая часть кишечника здорового человека представлена в основном тремя группами бактерий: 1) облигатная микрофлора (более 90%) включает в себя непатогенные виды бактерий (бифидобактерии, бактероиды, лактобактерии, кишечную палочку, энтерококки) и выполняет основные физиологические функции организма (пищеварение, всасывание); 2) факультативная микрофлора (менее 10%) включает в себя условно-патогенные микроорганизмы (клубоциды, стафилококки, протеи, кампилобактерии, дрожжеподобные грибы и др.) и участвует в защитной и пищеварительной функциях; 3) транзитная (случайная) микрофлора (не более 1%), представлена синегнойной палочкой, грибами рода кандиды, патогенными энтеробактериями и др. По результатам бактериологического анализа кала в нашей выборке здоровые доноры (четыре человека из 23) характеризовались достаточным количеством бифидобактерий, лактобактерий, эшерихий и энтерококков, а также содержали в пределах нормы условно-патогенные бактерии, что соответствует нормативным документам [22]. Большая часть обследованных (17 из 23) имели дисбиотические нарушения: недостаточное количество представителей облигатной микрофлоры, либо повышенное содержание факультативной и транзитной микрофлоры, что может быть вызвано несбалансированным питанием и частыми стрессами.

Очевидно, что бактериологическое исследование кала не может дать полную картину разнообразия

микрофлоры кишечника, поскольку в микробиоте могут присутствовать некультивируемые бактерии, а также бактерии в незначительном количестве, вследствие чего тоже не поддающиеся культивированию на искусственных питательных средах. На сегодняшний день для более точного изучения кишечной микробиоты применяют полногеномное секвенирование и метагеномный анализ. В то же время необходимо понимать, что в рамках медицинского обследования пациентам проводят только бактериологический анализ в сочетании с биохимическими маркерами, и на основании их результатов делают заключение о состоянии здоровья. Так называемые методы омиксного анализа не являются на сегодняшний день рутинными в практике врача-клинициста. Безусловно, для понимания точного механизма действия ТФМ и, возможно, выделения наиболее активных компонентов необходимы мультидисциплинарные комплексные исследования. В то же время все больше лечебных учреждений внедряют в свою практику ТФМ и могут использовать для подбора доноров лишь рутинные исследования. Таким образом, важно понимание значимости анализа наличия генов резистентности в биоматериале, применяемом для ТФМ.

В данной работе сфокусировано внимание на анализе встречаемости генов *tef* и *ermB*, обуславливающих резистентность к макролидам, линкозамидам и стрептомицину В. Согласно полученным данным в образцах кала всех 23 здоровых добровольцев обнаружены оба гена резистентности, *tef* и *ermB*.

В дополнительно сформированной группе мать-дети были выявлены следующие результаты. Ген *tef* обнаружили во всех образцах грудного молока и в образцах кала следующих категорий участников, которые никогда не принимали АБП: младенцев до 1 года, находящихся на грудном вскармливании; младенцев на искусственном вскармливании; детей 1–3 лет. Данный ген был выявлен также у всех взрослых и троих детей, возрастом 3–7 лет, которые больше года не принимали АБП. Результаты нашего исследования совпадают с данными другой работы, где частота встречаемости гена *tef* в кале новорожденных составляет 100% [22].

Ген *ermB* не был детектирован в образцах кала трех младенцев. При этом двое из них находились на грудном

вскармливании и молоко матери не содержало данный ген, одного младенца вскармливали искусственно. Стоит также отметить, что у одного из младенцев, молоко матери которого не содержит ген *ermB*, данный ген присутствует в кале. У двух детей до года, находящихся на искусственном вскармливании, в кале присутствует ген *ermB*. Вопрос приобретения генетических детерминант в кале новорожденных в пренатальный период, во время родов или после не изучен окончательно. В предыдущих исследованиях было подтверждено, что гены резистентности в фекалиях новорожденных были приобретены после рождения (например, через грудное молоко и/или воздух или питьевую воду, поскольку в амниотической жидкости и меконии новорожденных гены резистентности не были обнаружены) [23–25].

## ВЫВОДЫ

Анализ микробиологического состава кала 23 потенциально здоровых добровольцев показал, что только 8,7% участников исследования имеют соответствующую нормам микробиоту дистальной части кишечника и могут быть рассмотрены в качестве потенциальных доноров для ТФМ. Это может свидетельствовать о проблеме с составом микробиоты населения в целом. Дополнительно в ходе исследования проанализирована встречаемость генетических маркеров лекарственной устойчивости *tef* и *ermB* среди разных возрастных групп населения, включая младенцев. Показана высокая частота выявления гена устойчивости к макролидам (*tef*) — 97,8%, гена устойчивости к макролидам, линкозамидам, стрептограмину (*ermB*) — 93,5%. В группе «мать-дети» ген *tef* обнаружен во всех образцах кала и грудного молока. Таким образом, ввиду того, что гены *tef* и *ermB* можно обнаружить не только у взрослого населения, но и в столь раннем возрасте нами было выдвинуто предположение, что использование трансплантата (кала), содержащего данные гены, допустимо для ТФМ. Представленные данные могут помочь клиницистам, внедряющим методику ТФМ в практику, при самостоятельном поиске доноров и подготовке биоматериала.

## Литература

- Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. Gut. 2017; 66 (4): 569–80. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-313017.
- Baurwall SMD, Lee MM, Eriksen MK, Mullish BH, Marchesi JR, Dahlerup JF, et al. Faecal microbiota transplantation for recurrent Clostridioides difficile infection: An updated systematic review and meta-analysis. EClinicalMedicine. 2020; 23: 29–30. PMID: 33437951; PMCID: PMC7788438. DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100642.
- Wang Y, Zhang S, Borody T, Zhang F. Encyclopedia of fecal microbiota transplantation: a review of effectiveness in the treatment of 85 diseases. Chinese Medical Journal. 2022; 10.1097/CM9.0000000000002339 DOI: 10.1097/CM9.0000000000002339.
- Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of Clostridium difficile infections. Am J Gastroenterol. 2013; 108 (4): 478–98.
- Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection. Clin Microbiol Infect. 2014; 20 (Suppl 2): 1–26.
- Enforcement Policy Regarding Investigational New Drug Requirements for Use of Fecal Microbiota for Transplantation to Treat Clostridium difficile Infection Not Responsive to Standard Therapies. 2013; www.fdagov.
- Щербаков П. Л., Белова Н. Д., Генерозов Э. В., Жгун Е. С., Иванова О. И., Ильина Е. Н. и др. Применение фекальной трансплантации в лечении заболеваний пищеварительного тракта (первый клинический опыт). Доктор.Ру. 2019; 3 (158): 40–46. DOI: 10.31550/1727-2378-2019-158-3-40-46.
- Якупова А. А., Абдулхаков С. Р., Сафин А. Г., Алиева И. М., Ослопова Ю. В., Абдулхаков Р. А. Трансплантация фекальной микробиоты: критерии выбора донора, подготовки и хранения биоматериала (обзор современных рекомендаций). Терапевтический архив. 2021; 93 (2): 215–21. DOI: 10.26442/00403660.2021.02.200615.
- Эйдельштейн М. В. Экстремально- и панрезистентные клоны бактериальных возбудителей в клинике. Тезисы




- докладов ежегодной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2015)», 25 ноября 2015, Москва Журнал МедиАль. 2015; 3 (17).
10. Туркутюков В. Б. Молекулярно-генетический мониторинг резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Тихоокеанский медицинский журнал. 2011; 2 (44): 28–31.
  11. Zhuangab M, Achmonab Y, Cao Y, Liang X, Chen L, Wange H, et al. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*. 2021; 285. Article 117402. DOI: [10.1016/j.envpol.2021.117402](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402).
  12. Roberts MC. Environmental macrolide–lincosamide–streptogramin and tetracycline resistant bacteria *Front. Microbiol.* 2011. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00040>.
  13. Катосова Л. К., Лазарева А. В., Хохлова Т. А., Пономаренко О. А., Алябьева Н. М. Распространение и механизмы устойчивости к макролидам *Streptococcus pyogenes*, выделенных у детей. *Антибиотики и химиотерапия*. 2016; 61 (3–4): 23–29.
  14. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Morris L, Buckridge S, Felmingham D. Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both erm(B)- and mef(A)-mediated macrolide resistance. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (2): 764–8. DOI: [10.1128/JCM.42.2.764-768.2004](https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.764-768.2004). PMID: 14766850; PMCID: PMC344484.
  15. Reinert RR, Ringelstein A, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Schmitz FJ. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (3): 1294–300. DOI: [10.1128/JCM.43.3.1294-1300.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1294-1300.2005). PMID: 15750098; PMCID: PMC1081259.
  16. Икрянникова Л. Н., Сенина М. Е., Лисицина Е. С., Огородова Л. М., Федосенко С. В., Карнаушкина М. А. и др. Видовая идентификация и анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости стрептококков с помощью количественной мультиплексной полимеразной цепной реакции у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. *Пульмонология*. 2014; (6): 40–48. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-6-40-48>.
  17. Федосенко С. В., Огородова Л. М., Ильина Е. Н., Сенина М. Е., Лисицина Е. С., Карнаушкина М. А. и др. Генетические детерминанты устойчивости орофарингеальных стрептококков к антибактериальным средствам у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и больных бронхиальной астмой. *Терапевтический архив*. 2015; 87 (8): 51–57. DOI: [10.17116/terarkh201587851-57](https://doi.org/10.17116/terarkh201587851-57).
  18. Gosalbes MJ, Vallès Y, Jiménez-Hernández N, Balle C, Riva P, Miravet-Verde S, et al. High frequencies of antibiotic resistance genes in infants' meconium and early fecal samples. *J Dev Orig Health Dis.* 2016; 7: 35–44. DOI: [10.1017/S2040174415001506](https://doi.org/10.1017/S2040174415001506).
  19. Эпштейн-Литвак Р. В., Вильшанская Ф. Л. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника. Методические рекомендации. М., 1977; 20 с.
  20. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника: ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ Минздрава России № 231 от 09.06.03. (Отраслевой стандарт).
  21. U.S. Food and Drug Administration. Information pertaining to additional safety protections regarding use of fecal microbiota for transplantation — screening and testing of stool donors for multi-drug resistant organisms. 2019. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/information-pertaining-additional-safety-protections-regarding-use-fecal-microbiota-transplantation>.
  22. Klassert TE, Zubiria-Barrera C, Kankel S, Stock M, Neubert R, Lorenzo-Diaz F, et al. Early Bacterial Colonization and Antibiotic Resistance Gene Acquisition in Newborns. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 332. DOI: [10.3389/fcimb.2020.00332](https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00332). PMID: 32754449; PMCID: PMC7366792.
  23. Zhang K, Jin M, Yang D, Shen Z, Liu W, Yin J, et al. Antibiotic resistance genes in gut of breast-fed neonates born by caesarean section originate from breast milk and hospital ward air. *BMC Microbiol.* 2022; 36. DOI: [10.1186/s12866-022-02447-8](https://doi.org/10.1186/s12866-022-02447-8).
  24. Huang MS, Cheng CC, Tseng SY, Lin YL, Lo HM, Chen PW. Most commensally bacterial strains in human milk of healthy mothers display multiple antibiotic resistance. *Microbiology Open.* 2019; 8 (1): e00618 doi.org/10.1002/mbo3.618.
  25. Carvalho MJ, Sands K, Thomson, Portal KE, Mathias J, Milton R, et al. Antibiotic resistance genes in the gut microbiota of mothers and linked neonates with or without sepsis from low- and middle-income countries. *Nat Microbiol.* 2022; 7: 1337–47. Available from: [doi.org/10.1038/s41564-022-01184-y](https://doi.org/10.1038/s41564-022-01184-y).

## References

1. Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut.* 2017; 66 (4): 569–80. DOI: [10.1136/gutjnl-2016-313017](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313017).
2. Baunwall SMD, Lee MM, Eriksen MK, Mullish BH, Marchesi JR, Dahlerup JF, et al. Faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridioides difficile* infection: An updated systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine.* 2020; 23: 29–30. PMID: 33437951; PMCID: PMC7788438. DOI: [10.1016/j.eclinm.2020.100642](https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100642).
3. Wang Y, Zhang S, Borody T, Zhang F. Encyclopedia of fecal microbiota transplantation: a review of effectiveness in the treatment of 85 diseases. *Chinese Medical Journal.* 2022; 10.1097/CM9.0000000000002339 DOI: [10.1097/CM9.0000000000002339](https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002339).
4. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol.* 2013; 108 (4): 478–98.
5. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical M, Infectious D: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 (Suppl 2): 1–26.
6. Enforcement Policy Regarding Investigational New Drug Requirements for Use of Fecal Microbiota for Transplantation to Treat *Clostridium difficile* Infection Not Responsive to Standard Therapies. 2013; [www.fdagov](http://www.fdagov).
7. Shherbakov PL, Belova ND, Generozov EhV, Zhgun ES, Ivanova OI, Il'ina EN, i dr. Primenenie fekal'noj transplantacii v lechenii zabolevanij pishhevaritel'nogo trakta (pervyj klinicheskij opyt). *Doktor.Ru.* 2019; 3 (158): 40–46. DOI: [10.31550/1727-2378-2019-158-3-40-46](https://doi.org/10.31550/1727-2378-2019-158-3-40-46). Russian.
8. Yakupova AA, Abdulxakov SR, Safin AG, Alieva IM, Oslopova YuV, Abdulxakov RA. Transplantaciya fekal'noj mikrobioty: kriterii vybora donora, podgotovki i xraneniya biomateriala (obzor sovremennyx rekomendacij). *Terapevicheskij arxiv.* 2021; 93 (2): 215–21. DOI: [10.26442/00403660.2021.02.200615](https://doi.org/10.26442/00403660.2021.02.200615). Russian.
9. Ehjdel'shtejn MV. Ehkstremal'no- i panrezistentnye klony bakterial'nyx vzbuditelej v klinike. Tezisy dokladov ezhegodnoj Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii s mezhdunarodnym uchastiem «Kontrol' i profilaktika infekcij, svyazannyx s okazaniem medicinskoj pomoshhi (ISMP-2015)», 25 noyabrya 2015, Moskva Zhurnal MediAl'. 2015, 3 (17). Russian.
10. Turkutyukov VB. Molekulyarno-geneticheskij monitoring rezistentnosti mikroorganizmov k antibiotikam. *Tixookeanskij medicinskij zhurnal.* 2011; 2 (44): 28–31. Russian.
11. Zhuangab M, Achmonab Y, Cao Y, Liang X, Chen L, Wange H, et al. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution.* 2021; 285. Article 117402. DOI: [10.1016/j.envpol.2021.117402](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402).
12. Roberts MC. Environmental macrolide–lincosamide–streptogramin and tetracycline resistant bacteria *Front. Microbiol.* 2011. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00040>.
13. Katosova LK, Lazareva AV, Xoxlova TA., Ponomarenko OA, Alyabeva NM. Rasprostranenie i mexanizmy ustojchivosti k makrolidam *Streptococcus pyogenes*, vydelennyx u detej.

- Antibiotiki i ximioterapiya. 2016; 61 (3–4): 23–29. Russian.
14. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Morris L, Buckridge S, Felmingham D. Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both erm(B)- and mef(A)-mediated macrolide resistance. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (2): 764–8. DOI: 10.1128/JCM.42.2.764–768.2004. PMID: 14766850; PMCID: PMC344484.
15. Reinert RR, Ringelstein A, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Schmitz FJ. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (3): 1294–300. DOI: 10.1128/JCM.43.3.1294–1300.2005. PMID: 15750098; PMCID: PMC1081259.
16. Ikryannikova LN, Senina ME, Lisicina ES, Ogorodova LM, Fedosenko SV, Karnaushkina MA, i dr. Vidovaya identifikaciya i analiz geneticheskix markerov lekarstvennoj ustojchivosti streptokokkov s pomoshh'yu kolichestvennoj mul'tipleksnoj polimeraznoj cepnoj reakcii u pacientov s xronicheskoi obstruktivnoj bolezniyu legkix. *Pul'monologiya.* 2014; (6): 40–48. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-6-40-48>. Russian.
17. Fedosenko SV, Ogorodova LM, Ilina EN, Senina ME, Lisicina ES, Karnaushkina MA, i dr. Geneticheskie determinanty ustojchivosti orofaringeal'nyx streptokokkov k antibakterial'nym sredstvam u pacientov s xronicheskoy obstruktivnoj bolezniyu legkix i bol'nyx bronxial'noj astmoj. *Terapevticheskij arxiv.* 2015; 87 (8): 51–57. DOI: 10.17116/terarkh201587851-57. Russian.
18. Gosalbes MJ, Vallès Y, Jiménez-Hernández N, Balle C, Riva P, Miravet-Verde S, et al. High frequencies of antibiotic resistance genes in infants' meconium and early fecal samples. *J Dev Orig Health Dis.* 2016; 7: 35–44. DOI: 10.1017/S2040174415001506.
19. Ehpshitejn-Litvak RV, Vilshanskaya FL. Bakteriologicheskaya diagnostika disbakterioza kishechnika. *Metodicheskie rekomendacii.* M., 1977; 20 s. Russian.
20. Protokol vedeniya bol'nyx. Disbakterioz kishechnika: OST 91500.11.0004-2003. Prikaz Minzdrava Rossii # 231 ot 09.06.03. (Otraslevoj standart). Russian.
21. U.S. Food and Drug Administration. Information pertaining to additional safety protections regarding use of fecal microbiota for transplantation — screening and testing of stool donors for multi-drug resistant organisms. 2019. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/information-pertaining-additional-safety-protections-regarding-use-fecal-microbiota-transplantation>.
22. Klassert TE, Zubiria-Barrera C, Kankel S, Stock M, Neubert R, Lorenzo-Diaz F, et.al. Early Bacterial Colonization and Antibiotic Resistance Gene Acquisition in Newborns. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 332. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00332. PMID: 32754449; PMCID: PMC7366792.
23. Zhang K, Jin M, Yang D, Shen Z, Liu W, Yin J, et al. Antibiotic resistance genes in gut of breast-fed neonates born by caesarean section originate from breast milk and hospital ward air. *BMC Microbiol.* 2022; 36. DOI: [org/10.1186/s12866-022-02447-8](https://doi.org/10.1186/s12866-022-02447-8).
24. Huang MS, Cheng CC, Tseng SY, Lin YL, Lo HM, Chen PW. Most commensally bacterial strains in human milk of healthy mothers display multiple antibiotic resistance. *Microbiology Open.* 2019; 8 (1): e00618 [doi.org/10.1002/mbo3.618](https://doi.org/10.1002/mbo3.618).
25. Carvalho MJ, Sands K, Thomson, Portal KE, Mathias J, Milton R, et al. Antibiotic resistance genes in the gut microbiota of mothers and linked neonates with or without sepsis from low- and middle-income countries. *Nat Microbiol.* 2022; 7: 1337–47. Available from: [doi.org/10.1038/s41564-022-01184-y](https://doi.org/10.1038/s41564-022-01184-y).

## ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У БОЛЬНЫХ ЮВЕНИЛЬНЫМ ИДИОПАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ

М. В. Поросюк, Д. Д. Клементьев, Н. А. Ходов, Л. Н. Гуменюк , Э. С. Эсатова, Е. В. Середа, К. С. Четверухина-Малова, Е. В. Сарчук, С. В. Иванов


Медицинская академия имени С. И. Георгиевского, Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского, Симферополь, Россия

На сегодняшний день остается актуальной проблема взаимосвязи микробиоты кишечника и ювенильного идиопатического артрита (ЮИА). Целью исследования было изучить изменения таксономического состава микробиоты кишечника и оценить на уровне родов характер их взаимосвязи с кортизолом, мелатонином и TNF $\alpha$  у больных ЮИА. В одномоментном сравнительном исследовании приняли участие 65 больных ЮИА (основная группа) и 60 здоровых детей (контрольная группа). Оценивали таксономический состав микробиоты кишечника, уровни кортизола, мелатонина и TNF $\alpha$  в плазме крови. У больных ЮИА обнаружены изменения таксономического состава микробиоты кишечника: статистически значимое снижение численности *Anaerostipes* ( $p = 0,042$ ), *Lachnospira* ( $p = 0,034$ ), *Roseburia* ( $p = 0,002$ ), *Coprococcus* ( $p = 0,014$ ), *Dialister* ( $p = 0,003$ ) и повышение численности *Ruminococcus* ( $p = 0,012$ ). Установлена статистически значимая корреляция значений кортизола с уровнем бактерий *Lachnospira* ( $r = -0,44$ ;  $p = 0,001$ ), концентрации мелатонина и уровнем бактерий *Coprococcus* ( $r = -0,48$ ;  $p = 0,023$ ), значений TNF $\alpha$  и уровнем бактерий *Ruminococcus* ( $r = 0,52$ ;  $p = 0,001$ ). Также выявлена сопряженность численности бактерий *Lachnospira*, *Roseburia* и *Ruminococcus* с более высокими показателями по DAS28 ( $r = -0,57$ ;  $p = 0,002$ ;  $r = -0,44$ ;  $p = 0,002$ ;  $r = 0,54$ ;  $p = 0,032$  соответственно). Результаты предоставляют дополнительные данные об особенностях изменений микробиоты кишечника и их связи с некоторыми гормональными и воспалительными биомаркерами при ЮИА, что может стать обоснованием для проведения дальнейших исследований, а также, возможно, открывает новые подходы к терапии этого заболевания.

**Ключевые слова:** ювенильный идиопатический артрит, микробиота кишечника, кортизол, мелатонин, TNF $\alpha$

**Вклад авторов:** М. В. Поросюк, Д. Д. Клементьев — сбор, анализ и интерпретация данных; Л. Н. Гуменюк — идея и дизайн исследования; Н. А. Ходов, Э. С. Эсатова, Е. В. Середа — статистическая обработка данных; К. С. Четверухина-Малова, Е. В. Сарчук, С. В. Иванов — подготовка статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Крымской медицинской академии имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» (протокол № 10 от 16 ноября 2020 г.), спланировано и проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией. Все лица, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие.

 **Для корреспонденции:** Леся Николаевна Гуменюк  
бул. Ленина, 5/7, г. Симферополь, 295006, Республика Крым; lesya\_gumenyuk@mail.ru

**Статья получена:** 01.11.2022 **Статья принята к печати:** 29.11.2022 **Опубликована онлайн:** 19.12.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.060

## GUT MICROBIOTA ALTERATIONS IN PATIENTS WITH JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS

Porosyuk MV, Klementiev DD, Hodov NA, Gumenyuk LN , Esatova ES, Sereda EV, Chetveruhina-Malova KS, Sarchuk EV, Ivanov SV


Georgievsky Medical Academy, Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

Currently, the issue of the relationship between gut microbiota and juvenile idiopathic arthritis (JIA) is still relevant. The study was aimed to assess alterations in the gut microbiota taxonomic composition and estimate the relationship between these alterations and cortisol, melatonin, and TNF $\alpha$  at the genus level in patients with JIA. The comparative cross-sectional study involved 65 patients with JIA (index group) and 60 healthy children (control group). The gut microbiota taxonomic composition and plasma levels of cortisol, melatonin, and TNF $\alpha$  were assessed. The following alterations of the gut microbiota taxonomic composition were found in patients with JIA: the significantly decreased abundance of *Anaerostipes* ( $p = 0.042$ ), *Lachnospira* ( $p = 0.034$ ), *Roseburia* ( $p = 0.002$ ), *Coprococcus* ( $p = 0.014$ ), *Dialister* ( $p = 0.003$ ) and the increase in the abundance of *Ruminococcus* ( $p = 0.012$ ). There were significant correlations of cortisol levels with the abundance of *Lachnospira* ( $r = -0.44$ ;  $p = 0.001$ ), melatonin concentrations and the abundance of *Coprococcus* ( $r = -0.48$ ;  $p = 0.023$ ), the levels of TNF $\alpha$  and the abundance of *Ruminococcus* ( $r = 0.52$ ;  $p = 0.001$ ). The association of the *Lachnospira*, *Roseburia*, and *Ruminococcus* abundance with the higher DAS28 scores was discovered ( $r = -0.57$ ;  $p = 0.002$ ;  $r = -0.44$ ;  $p = 0.002$ ;  $r = 0.54$ ;  $p = 0.032$ , respectively). The findings provide additional information about the features of gut microbiota alterations and their correlation with some hormone and inflammatory biomarkers associated with JIA, that could provide the basis for further research and possibly for new approaches to treatment of this disorder.

**Keywords:** juvenile idiopathic arthritis, gut microbiota, cortisol, melatonin, TNF $\alpha$

**Author contribution:** Porosyuk MV, Klementiev DD — data acquisition, analysis, and interpretation; Gumenyuk LN — study concept and design; Hodov NA, Esatova ES, Sereda EV — statistical data processing; Chetveruhina-Malova KS, Sarchuk EV, Ivanov SV — manuscript writing

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the S.I. Georgievsky Medical Academy, V. I. Vernadsky Crimean Federal University (protocol № 10 of 16 November 2020), planned and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The informed consent was submitted by all the subjects enrolled.

 **Correspondence should be addressed:** Lesya N. Gumenyuk  
Lenina bulvar, 5/7, Simferopol, 295006, Republic of Crimea; lesya\_gumenyuk@mail.ru

**Received:** 01.11.2022 **Accepted:** 29.11.2022 **Published online:** 19.12.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.060

Ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) — артрит неизвестной этиологии, длительностью более шести недель, возникающий у детей в возрасте до 16 лет [1]. Заболеваемость ЮИА в мире варьирует от 0,8 до 22,6 случаев на 100 000 детей в год, уровень распространенности составляет 7–401 случай на 100 000 детей в год [2]. В связи

с значительной распространенностью, существенным снижением качества жизни детей и высоким уровнем ранней инвалидизации [3] ЮИА остается одной из актуальных медико-социальных проблем.

Доказано, что ЮИА — мультифакториальное заболевание, патофизиология которого сложна и недостаточно

изучена. В свете современных представлений одним из центральных звеньев патологического процесса при ЮИА является абберантное продуцирование цитокинов, сопровождаемое дисрегуляцией иммунного ответа [4]. В данном аспекте особый интерес представляет фактор некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ), рассматриваемый рядом авторов как «ранний» цитокин, появляющийся в дебюте воспалительной реакции [5] и играющий значимую роль в хронизации патологического процесса [6]. Есть данные, что у больных ЮИА уровень TNF $\alpha$  ассоциирован с активностью воспаления, в том числе связан с деструкцией хряща и кости, потерей костной ткани [5], а значительно повышенный плазменный уровень TNF $\alpha$  служит предиктором развития тяжелого осложнения — синдрома активации макрофагов [5]. Вместе с тем иммунная система тесно сопряжена с нейроэндокринной. В литературе активно обсуждают глубокую вовлеченность дисрегуляции эпифизарно-гипофизарно-надпочечниковой оси в механизмы формирования и прогрессирования клинических симптомов ЮИА, и особое значение при этом имеют изменения секреции мелатонина и кортизола [7, 8]. Оценка гормонального профиля крови у больных ЮИА позволила обнаружить повышенный уровень кортизола и сниженный уровень мелатонина [7, 8]. Кроме того, повышенный уровень кортизола был связан с клиническими маркерами воспаления [8], в то время как для мелатонина выявлена ассоциация с активностью процесса, показателем скорости оседания эритроцитов (СОЭ) и уровнем иммуноглобулина М [8].

Современные исследования свидетельствуют о роли кишечной микробиоты в развитии и прогрессировании ЮИА, что обусловлено ее ключевой ролью в нейро-иммунно-эндокринной регуляции. Так, для больных ЮИА характерны изменение микробного ландшафта и дисбаланс представителей кишечной микробиоты [9–11], некоторые из которых значительно коррелируют с такими воспалительными биомаркерами, как антитела к циклическому цитруллиновому пептиду, ревматоидный фактор и С-реактивный белок [12]. Кроме того, некоторые микробные представители присутствуют в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом [13] и ткани печени людей и мышей [14], что может вызывать аутоиммунные реакции [13, 14]. Наконец, показано, что лечение дисбиоза кишечной микробиоты специальной четырехнедельной углеводной диетой способствовало снижению плазменного уровня TNF $\alpha$ , количества воспаленных суставов, выраженности болевого синдрома, утренней скованности и повышению физической активности у больных ЮИА [15]. Однако многие аспекты взаимосвязи между микробиотой кишечника с воспалительными и гормональными биомаркерами у больных ЮИА остаются не до конца изученными. Отсутствуют сведения о взаимосвязи между представителями микробиоты кишечника и уровнями кортизола, мелатонина и TNF $\alpha$  при ЮИА.

Таким образом, проблема взаимосвязи микробиоты кишечника и ЮИА остается актуальной. Цель исследования — изучить изменения таксономического состава микробиоты кишечника и оценить на уровне родов характер их взаимосвязи с кортизолом, мелатонином и TNF $\alpha$  у больных ЮИА.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В сравнительном одномоментном исследовании приняли участие 65 пациентов с ЮИА (основная группа) (39 девочек

(60,0%), 26 мальчиков (40,0%); средний возраст — 10,3 [3,1; 11,6] лет), обратившихся за помощью в Детскую поликлинику № 1 и Детскую поликлинику № 3 (г. Симферополь, Республика Крым), и 60 здоровых детей (контрольная группа, КГ) (35 девочек (58,3%), 25 мальчиков (41,7%); средний возраст — 9,9 [3,2; 11,8] лет), проходивших ежегодный профилактический медицинский осмотр на базе медицинского центра «Гемокод» (г. Симферополь, Республика Крым), соответствующих критериям включения и исключения.

Критерии включения: наличие впервые верифицированного диагноза ЮИА; возраст детей — от 1 до 16 лет; длительность ЮИА — от 6 недель до 6 месяцев; отсутствие лечения нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП), генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП) и стероидами; наличие информированного согласия родителей на участие ребенка в исследовании.

Критерии исключения: наличие системного ЮИА, дефицита [16] — представлены критерии верификации дефицита массы тела у детей или избыточной массы тела [17]; сопутствующие соматические заболевания; синдром раздраженного кишечника; хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, печени; бактериальные, вирусные и грибковые инфекционные заболевания; психические расстройства; наличие нарушений стула (запоры / диарея) в предшествующий месяц до начала исследования; прием антибиотиков, пробиотиков, пребиотиков, противовирусных, симбиотических или кислотоподавляющих препаратов в предшествующие три месяца до начала исследования; прием препаратов, влияющих на стул в предшествующий месяц до начала исследования; отказ от участия в исследовании.

Критерии включения здоровых добровольцев: возраст от 1 до 16 лет; отсутствие хронических заболеваний и аллергических реакций; частота респираторных заболеваний не больше трех раз в год; отсутствие инфекционных и острых заболеваний в течение двух предыдущих месяцев перед исследованием; отсутствие нарушений стула (запоры / диарея) в предшествующий месяц до начала исследования; отказ от приема пробиотиков, пребиотиков, симбиотических препаратов в предшествующие три месяца до начала исследования; отказ от приема препаратов, влияющих на стул в предшествующий месяц до начала исследования; отсутствие психических расстройств в анамнезе; наличие информированного согласия родителей на участие ребенка в исследовании.

Критерии исключения здоровых детей: температура тела выше 36,9 °C; отказ от участия в исследовании.

Верификацию диагноза ЮИА проводили согласно классификационным критериям Всемирной лиги ревматологических ассоциаций (ILAR) второго пересмотра (2001 г.) [18]. С целью объективизации степени активности заболевания мы использовали индекс активности заболевания (Disease activity score, DAS) для 28 суставов (DAS28): ремиссия — < 2, 6 баллов; низкая активность — 2,6–3,0 баллов; 3,1–5,0 баллов — умеренная активность; 5,1 и более баллов — высокая активность заболевания [19].

Для анализа таксономического состава микробиоты кишечника были взяты образцы кала утром в день госпитализации (с 8.00 до 11.00), которые замораживали и хранили в одноразовых пластиковых контейнерах при температуре –80 °C до проведения метагеномного анализа. Выделение тотальной ДНК проводили методом фенольной



Таблица 1. Характеристика больных ЮИА и здоровых детей

Показатель	Больные ЮИА (n = 65)	Контрольная группа (n = 60)
Девочки/мальчики, n (%)	39 (60,0)/26 (40,0)	35 (58,3)/25 (41,7)
Средний возраст, годы, медиана [25%; 75%]	10,3 [3,1; 11,6]	9,9 [3,2; 11,8]
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup> , медиана [25%; 75%]	16,2 [15,1; 18,3]	16,6 [15,7; 18,1]

экстракции. Амплификацию фрагментов вариабельных регионов V3–V4 гена 16S рПНК осуществляли с использованием универсальных праймеров. Анализ V3–V4 региона 16S рПНК кишечной микробиоты проводили на секвенаторе SOLiD5500 Wildfire (Applied Biosystems; США) методом парно-концевого чтения с суммарным покрытием не менее 10 000 пар ридов на образец [20].

Фильтрацию прочтений по качеству и их таксономическую классификацию проводили с помощью программного обеспечения QIIME версии 1.9.1 [21]. Для определения таксономической принадлежности прочтений применяли подход, включающий в себя использование двух таксономических баз данных. На первом этапе осуществляли подбор референсного набора операционных таксономических единиц (OTE) бактерий на основании сравнения полученных прочтений генов 16S рПНК с базой данных GreenGenes версии 13.5 [22]. На втором этапе с использованием алгоритма RDP определение таксономической принадлежности данных OTE проводили на основе специализированной базы данных кишечной микробиоты человека HITdb [23].

Изучение качественного и количественного состава микробиоты кишечника осуществляли на основании определения видов, родов и фил микроорганизмов. Оценку  $\alpha$ -разнообразия сообщества путем расчета индекса Chao1, показателя числа обнаруженных таксонов (Sobs), показателя, оценивающего реальное количество таксонов (ACE), проводили с помощью программы Mothur v.1.22.0 (<http://www.mothur.org>).

Уровни кортизола, мелатонина и TNF $\alpha$  в сыворотке крови изучали с помощью твердофазного иммуоферментного анализа, применяя тест-системы («Вектор-Бест», Россия; и Immuno Biological Laboratories, Германия). Забор крови выполняли из кубитальной вены утром (7.00–9.00) натощак в состоянии покоя (не менее 15 мин).

Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc.; USA). При нормальном распределении показателей определяли среднее значение и стандартное отклонение; при распределении, отличном от нормального, — медиану, 25-й и 75-й процентиля. Нормальность распределения проверяли при помощи распределения Гаусса. Для

качественных признаков определяли долю и абсолютное количество значений. Сравнительный анализ для нормально распределенных количественных признаков проводили с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента, при распределении, отличном от нормального, — с помощью *U*-критерия Манна–Уитни, для качественных признаков — с помощью критерия  $\chi^2$  (хи-квадрат). Для оценки взаимосвязи признаков рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Применяли также корреляционный анализ и множественную ранговую корреляцию, достоверность корреляционных связей проверяли при помощи таблиц достоверности корреляции. Для корректировки множественных сравнений использовали поправки Bonferroni. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика больных ЮИА и здоровых детей представлена в табл. 1. Группы были сопоставимы по полу ( $p = 0,97$ ;  $\chi^2$ ), возрасту ( $p = 0,92$ ;  $\chi^2$ ) и индексу массы тела ( $p = 0,054$ ;  $\chi^2$ ).

Клиническая характеристика больных ЮИА представлена в табл. 2. Среди больных преобладали дети с олигоартритом и низкой активностью воспалительного процесса.

При изучении таксономического состава микробиоты кишечника у больных ЮИА по сравнению с детьми КГ выявлено статистически значимое снижение  $\alpha$ -разнообразия бактериального сообщества (индекс Chao1;  $p = 0,017$ ). Индексы ACE и Sobs в группе больных ЮИА по сравнению с КГ также были несколько снижены, при этом статистически значимых различий не найдено ( $p = 0,055$ ;  $p = 0,049$  соответственно) (рис. 1).

При сравнении родового состава кишечной микробиоты в группах обследованных установлено, что у больных ЮИА по сравнению с КГ статистически значимо снижена численность *Anaerostipes* ( $p = 0,042$ ), *Lachnospira* ( $p = 0,034$ ), *Roseburia* ( $p = 0,002$ ), *Coprococcus* ( $p = 0,014$ ), *Dialister* ( $p = 0,003$ ) и повышена численность *Ruminococcus* ( $p < 0,001$ ) (рис. 2).

У больных ЮИА по сравнению с детьми КГ плазменные значения кортизола и TNF $\alpha$  были статистически значимо

Таблица 2. Клиническая характеристика больных ювенильным идиопатическим артритом

Показатель	Больные ЮИА (n = 65)
Продолжительность заболевания, месяцы (M $\pm$ CD)	2,5 $\pm$ 1,5
Олигоартрит, n (%)	38 (58,5)
Полиартрит, n (%)	27 (41,5)
Ревматоидный фактор (+), n (%)	8 (12,3)
АЦЦП (+), n (%)	5 (7,7)
Низкая активность по DAS28, n (%)	49 (75,3)
Умеренная активность по DAS28, n (%)	12 (18,5)
Высокая активность по DAS28, n (%)	4 (6,2)
Итоговый показатель по DAS28, медиана [25%; 75%]	3,4 [2,9; 4,2]

Примечание: АЦЦП — антитела к циклическому цитруллинированному пептиду

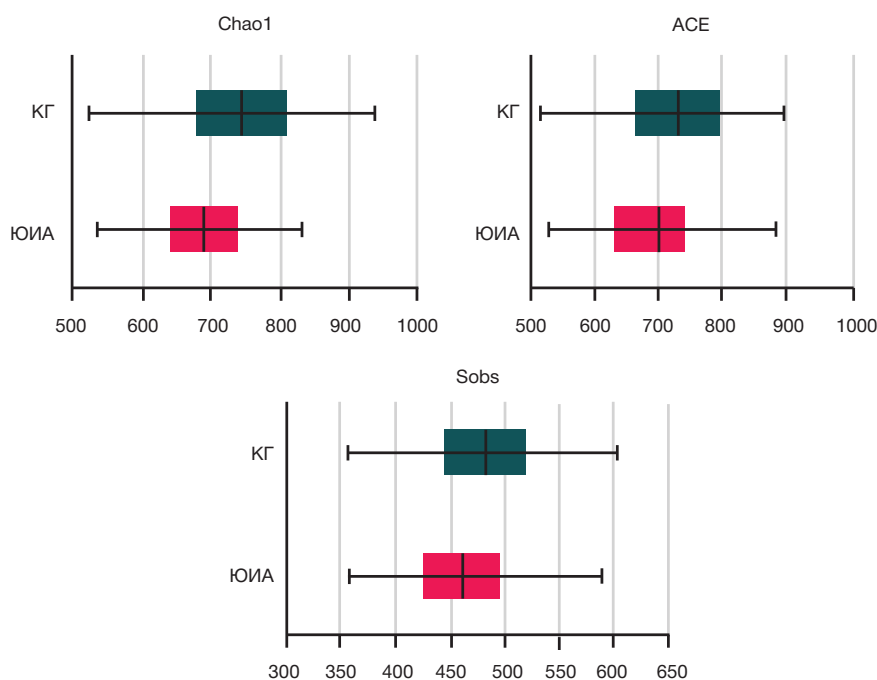


Рис. 1. Сравнительный анализ филогенетического состава микробиоты кишечника у больных ювенильным идиопатическим артритом и здоровых детей. ЮИА — ювенильный идиопатический артрит, КГ — контрольная группа

выше, а уровень мелатонина статистически значимо ниже (табл. 3).

Получены статистически значимые корреляционные связи значений кортизола и итогового показателя по DAS 28 с численностью бактерий *Lachnospira* ( $r = -0,44$  при  $p = 0,001$ ;  $r = -0,57$  при  $p = 0,002$  соответственно). Удалось также установить связь между уровнем мелатонина и численностью бактерий *Coprococcus* ( $r = -0,48$ ;  $p = 0,023$ ). Выявлены взаимосвязи уровня  $\text{TNF}\alpha$  и итогового показателя по DAS 28 с численностью бактерий *Ruminococcus* ( $r = 0,52$  при  $p = 0,001$ ;  $r = 0,54$  при  $p = 0,032$  соответственно). Итоговый показатель по DAS 28 имел обратную корреляционную связь с численностью бактерий *Roseburia* ( $r = -0,44$ ;  $p = 0,002$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании уточнены изменения таксономического состава микробиоты кишечника и изучена на уровне родов их связь с плазменными уровнями кортизола, мелатонина и  $\text{TNF}\alpha$  в группе больных ЮИА.

В ряде ранее выполненных работ сообщается об изменении состава микробиоты кишечника у больных ЮИА [9–11]. Результаты настоящего исследования тоже показали, что состав микробиоты кишечника у больных ЮИА значительно отличается от такового у здоровых детей. По нашим данным, у больных ЮИА по сравнению со здоровыми детьми наблюдается более низкое бактериальное  $\alpha$ -разнообразие, что согласуется с результатами ранее выполненных исследований [9, 10]. Кроме того, у больных ЮИА дисбиотические изменения кишечника характеризовались снижением численности бактерий с иммуномодулирующим потенциалом (представителей рода *Anaerostipes*, *Lachnospira*, *Roseburia*, *Coprococcus* и *Dialister*), которые, как известно, продуцируют короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) (бутират и пропионат). Снижение уровня последних приводит к активации гистондеацетилазы и ингибированию G-белковых рецепторов GPR41, GPR43 и GPR109A,

что способствует развитию хронического воспаления [24]. В то же время мы обнаружили повышенную численность потенциальных патобионтов — бактерий рода *Ruminococcus*. Полученные нами результаты частично соотносятся с данными ряда других ранее выполненных работ. Например, снижение относительной численности бактерий *Anaerostipes* и *Lachnospira* было характерно для больных ЮИА [11, 25], но эти данные противоположны результатам, наблюдаемым у пациентов с ревматоидным артритом [26]. В другой работе снижение численности *Anaerostipes*, *Lachnospira* и *Roseburia* было характерно для пациентов с COVID-19 [9]. В отличие от наших данных, в

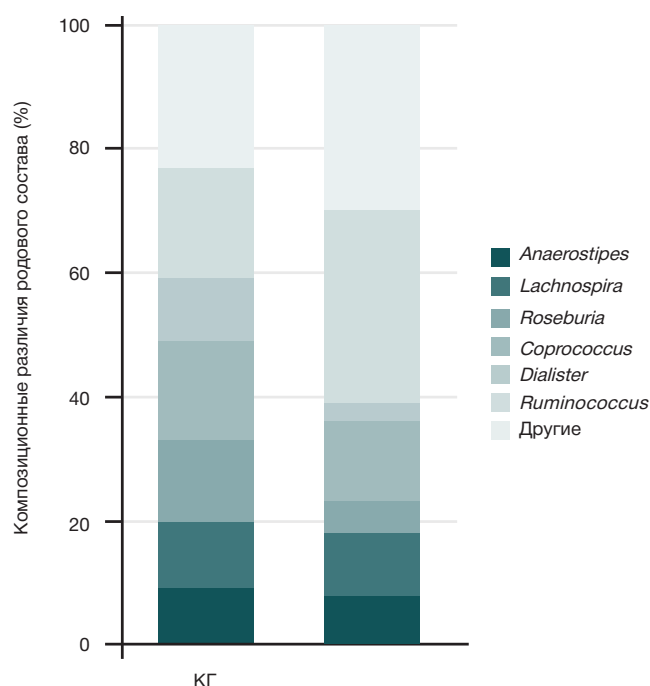


Рис. 2. Сравнительный анализ родового состава микробиоты кишечника у больных ЮИА и здоровых детей. ЮИА — ювенильный идиопатический артрит, КГ — контрольная группа



Таблица 3. Сравнительный анализ показателей кортизола, мелатонина и TNF $\alpha$  в плазме крови у больных ЮИА и здоровых детей

Показатель	Больные ЮИА (n = 65)	Контрольная группа (n = 60)	p
Кортизол, нмоль/л (m $\pm$ CD)	617,5 $\pm$ 17,6	326,1 $\pm$ 30,8	p < 0,001
Мелатонин, пг/мл (m $\pm$ CD)	21,1 $\pm$ 6,1	35,5 $\pm$ 9,2	p = 0,038
TNF $\alpha$ , пг/мл (m $\pm$ CD)	63,3 $\pm$ 1,8	4,6 $\pm$ 0,3	p < 0,001

Примечание: p — статистическая значимость различий показателей между группой ЮИА и контрольной группой.

работе [27] указывалось на повышение относительной численности *Dialister* у больных ЮИА. Контрастирование полученных результатов может быть обусловлено тем фактом, что, во-первых, исследования выполнены в различных географических регионах, а во-вторых, в отличие от вышеуказанных авторов, мы включали детей в КГ, сопоставимых с больными ЮИА по возрасту, полу и индексу массы тела, так как доказано влияние этих факторов на состав микробиоты кишечника. Кроме того, мы не включали больных ЮИА, которые принимали НПВП, ГИБП, стероидные и антибактериальные препараты с целью нивелирования их влияния на результаты исследования.

Несмотря на то что некоторые идентифицированные нами бактерии могут быть общими для ряда других кишечных и системных заболеваний, обнаруженная в настоящей работе сопряженность сниженного содержания бактерий *Lachnospira* и *Roseburia* и повышенного содержания бактерий *Ruminococcus* с более высокими показателями по DAS28 позволяет предположить, что изменения численности этих бактерий могут быть характерными для данной когорты больных ЮИА, а также быть основанием для рассмотрения их в качестве предикторов прогрессирования заболевания. Установленные нами ассоциации мы сопоставили с результатами ранее выполненных исследований. Так, у детей с ЮИА, поступивших на стационарное лечение в больницы провинции Чжэцзян, представленность *Lachnospira* и *Roseburia* обратно коррелировала с активностью заболевания, показателями АЦЦП и СОЭ [9]. Основываясь на данных о причинно-следственных связях между дисбиозом кишечника и метаболическими заболеваниями [28], можно предположить, что при ЮИА могут наблюдаться следующие последовательные трансформации: изменения микробиоты кишечника, а именно сокращение обилия бактерий, продуцирующих КЦЖК — снижение концентрации КЦЖК — иммунные дисфункции и, в итоге, развитие заболевания. Кроме того, возможно, что терапевтическое повышение численности *Lachnospira* и *Roseburia* и снижение численности *Ruminococcus* могут быть эффективными в отношении смягчения тяжести заболевания, однако для подтверждения данной гипотезы необходимо проведение дополнительных исследований с соответствующим дизайном.

Как указывалось ранее, у больных ЮИА обнаруживают значительно повышенные уровни кортизола, мелатонина и TNF $\alpha$ , роль которых в развитии и прогрессировании заболевания доказана [7, 8]. Результаты нашего исследования не расходятся с литературными данными: у больных ЮИА по сравнению со здоровыми детьми установлены статистически значимые различия в уровне кортизола, мелатонина и TNF $\alpha$ . Примечательно, что некоторые представители микробиоты кишечника у больных ЮИА ассоциированы с уровнями в плазме изученных биомаркеров; это может свидетельствовать о наличии

связи состава и численности микробиоты кишечника с этим заболеванием. Обратный характер ассоциации с плазменным уровнем кортизола был продемонстрирован для рода *Lachnospira*, что подтверждает вероятность активного участия этих бактерий в дисрегуляции активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО) при ЮИА. Мы не встретили работ, посвященных изучению связи между микробиотой кишечника и кортизолом у больных ЮИА. Вместе с тем есть сообщение, что у здоровых детей в возрасте 8–16 лет *Lachnospira* обратно коррелировала с продукцией кортизола [29]. Аналогичные данные представлены в работе [30]: снижение численности бактерий *Lachnospira* было сопряжено с более высоким уровнем кортизола у младенцев. В литературе нами было найдено возможное объяснение данной зависимости. Известно, что *Lachnospira* является одной из основных бутират-продуцирующих бактерий. В свою очередь КЦЖК способны влиять на синтез кортизола: семидневное введение физиологических доз КЦЖК непосредственно в толстую кишку приводило к повышению их содержания в системном кровотоке и ослаблению реакции кортизола на острый психосоциальный стресс у здоровых мужчин [31]. Обнаружено, что пероральное введение КЦЖК (67,5 мМ ацетата, 25 мМ пропионата и 25 мМ бутирата) в течение 7 дней у мышей способствовало ингибированию потенцированной острым стрессом секреции кортикостерона [32]. Поскольку КЦЖК способны пересекать гематоэнцефалический барьер (через циркумвентрикулярные органы), можно предположить, что они участвуют в модуляции активности ГГНО путем непосредственного влияния на секреторный тонус в гипофизарных нейронах медиального паравентрального ядра [33].

Выявлена сопряженность показателя мелатонина и численности бактерий *Coprococcus*, что может быть опосредовано блокировкой сигналов в системе p-CREB-связывающего белка — арилалкиламин-N-ацетилтрансферазы за счет снижения секреции триптофана [34], являющегося предшественником серотонина, из которого в последующем синтезируется мелатонин. В литературе нами была найдена подобная ассоциация у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа, что подтверждалось прямыми тесными корреляциями представленности *Coprococcus* с уровнями метаболитов триптофана и плазменного мелатонина [35].

Полученная в нашем исследовании прямая сильная корреляция уровня TNF $\alpha$  с численностью бактерий *Ruminococcus* позволяет предположить негативную роль последних в иммуногенезе ЮИА. Это можно объяснить следующим образом: воспалительный липополисахарид глюкорамнан, синтезируемый бактериями *Ruminococcus*, посредством активации TLR4-опосредованных реакций индуцирует выработку провоспалительных цитокинов, таких как TNF $\alpha$  и IL6, дендритными клетками костного мозга [36].

## ВЫВОДЫ

У больных ЮИА выявлены выраженные нарушения численности и таксономического состава микробиоты кишечника. Обнаруженные статистически значимые корреляции некоторых представителей микробиоты с DAS28 и гормональными, воспалительными биомаркерами свидетельствуют в пользу концепции о связи между

численностью и составом микробиоты кишечника и ЮИА. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения значимой роли микробиоты кишечника в патогенезе ЮИА. Актуальным остается вопрос о связи изменений микробиоты кишечника с гормональными биомаркерами. Целенаправленная коррекция микробиоты кишечника может способствовать повышению эффективности терапии ЮИА.

## Литература

- Rigante D, Bosco A, Esposito S. The Etiology of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015; 49 (2): 253–61. DOI: 10.1007/s12016-014-8460-9.
- Shiff NJ, Oen K, Kroeker K, Lix LM. Trends in population-based incidence and prevalence of juvenile idiopathic arthritis in Manitoba, Canada. *Arthritis Care Res*. 2019; 71 (3): 413–8.
- Гуменюк Л. Н., Кабатова И. Н. Особенности качества жизни больных ювенильным ревматоидным артритом на санаторно-курортном лечении. *Таврический медико-биологический вестник*. 2017; 20 (2): 32–35.
- Raghavendra VV, Singh AV, Shaji H Vohra, Kulkarni SK, Agrewala JN. Melatonin provides signal 3 to unprimed CD4(+) T cells but failed to stimulate LPS primed B cells. *Clin Exp Immunol*. 2001; 124: 414–22.
- Федоров Е. С., Салугина С. О., Кузьмина Н. Н. Роль цитокиновой сети в регуляции воспаления при различных вариантах ювенильного артрита. 2009; 3: 74–89.
- Беляева Л. М., Чижевская И. Д., Филонович Р. М. и др. Современные подходы к терапии ревматических болезней у детей. *Международный журнал педиатрии, акушерства и гинекологии*. 2013; 3 (3): 25–34.
- Кабатова И. Н. Состояние гормонального компонента адаптации у детей с ювенильным ревматоидным артритом. *Таврический медико-биологический вестник*. 2017; 20 (3): 43–48.
- Скоромная Н. Н. Роль эпифизарного гормона мелатонина в регуляции различных звеньев эндокринной системы у больных ювенильным ревматоидным артритом. *Здоровье ребенка*. 2012; 8 (43): 65–70.
- Qian X, Liu YX, Ye X, et al. Gut microbiota in children with juvenile idiopathic arthritis: characteristics, biomarker identification, and usefulness in clinical prediction. *BMC Genomics*. 2020; 21: 286.
- Di Paola M, Cavalieri D, Albanese D, et al. Alteration of fecal microbiota profiles in juvenile idiopathic arthritis. Associations with HLA-B27 allele and disease status. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1703.
- Tejesvi MV, Arvonen M, Kangas SM, et al. Faecal microbiome in new-onset juvenile idiopathic arthritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016; 35 (3): 363–70.
- Zhang X, Zhang D, Jia H, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med*. 2015; 21 (8): 895–905.
- Pianta A, Arvikar S, Strle K, et al. Evidence of the immune relevance of *Prevotella copri*, a gut microbe, in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2017; 69 (5): 964–75.
- Manfredo Vieira S, Hiltensperger M, Kumar V, et al. Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. *Science*. 2018; 359 (6380): 1156–61.
- Berntson L. A pilot study of possible anti-inflammatory effects of the specific carbohydrate diet in children with juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2021; 19 (1): 88.
- Ashworth A. Nutrition, food security, and health. In: Kliegman RM, Stanton BF, St Geme III JW, Schor NF, editors. *Nelson textbook of pediatrics*. 20th ed. New York: Elsevier, 2015.
- Gahagan S. Overweight and obesity. In: Kliegman RM, Stanton BF, St Geme III JW, Schor NF, editors. *Nelson textbook of pediatrics*. 20th ed. New York: Elsevier, 2015; 307–16.
- Petty RE, Southwood TR, Manners P, et al. International League of Associations for Rheumatology. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol*. 2004; 31: 390–2.
- Smolen JS, Breedveld FC, Eberl G, et al. Validity and reliability of the twenty-eight-joint count for the assessment of rheumatoid arthritis activity. *Arthritis Rheum*. 1995; 38: 38–43.
- Mitra S, Forster-Fromme K, Damms-Machado A., et al. Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics*. 2013; 14 (5): 16.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010; 7 (5): 335–6.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72: 5069–72.
- Ritari J, Salojärvi J, Lahti L, de Vos WM. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. *BMC Genomics*. 2015; 16 (1): 1056.
- Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients*. 2011; 3 (10): 858–76.
- Stoll ML, Weiss PF, Weiss JE, et al. Age and fecal microbial strain-specific differences in patients with spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2018; 20 (1): 14.
- Breban M, Tap J, Leboime A, et al. Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76 (9): 1614–22.
- Tito RY, Cypers H, Joossens M, et al. Brief report: dialister as a microbial marker of disease activity in Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2017; 69 (1): 114–21.
- Sanna S, van Zuydam NR, Mahajan A, et al. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat Genet*. 2019; 51 (4): 600–5.
- Michels N, Van de Wiele T, Fouhy F, et al. Gut microbiome patterns depending on children's psychosocial stress: Reports versus biomarkers. *Brain Behav Immun*. 2019; 80: 751–62.
- Rosin S, Xia K, Azcarate-Peril MA, et al. A preliminary study of gut microbiome variation and HPA axis reactivity in healthy infants. *Psychoneuroendocrinology*. 2021; 124: 105046.
- Daille B, Vervliet B, Bergonzelli G, et al. Colon-delivered short-chain fatty acids attenuate the cortisol response to psychosocial stress in healthy men: a randomized, placebo-controlled trial. *Neuropsychopharmacol*. 2020; 45: 2257–66.
- Van de Wouw M, Boehme M, Lyte JM, et al. Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain-gut axis alterations. *J Appl Physiol*. 2018; 596: 4923–44.
- Ziegler DR, Herman JP. Neurocircuitry of stress integration: anatomical pathways regulating the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis of the rat. *Integr Comp Biol*. 2002; 42: 541–51.
- Song L, He M, Sun Q, et al. Roseburia hominis Increases Intestinal Melatonin Level by Activating p-CREB-AANAT Pathway. *Nutrients*. 2022; 14: 117.
- Huang X, Qiu Y, Gao Y, et al. Gut microbiota mediate melatonin signalling in association with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2022; 65 (10): 1627–41.
- Henke MT, Kenny DJ, Cassilly CD, et al. *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci*. 2019; 116: 12672–7.

## References

- Rigante D, Bosco A, Esposito S. The Etiology of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015; 49 (2): 253-61. DOI: 10.1007/s12016-014-8460-9.
- Shiff NJ, Oen K, Kroeker K, Lix LM. Trends in population-based incidence and prevalence of juvenile idiopathic arthritis in Manitoba, Canada. *Arthritis Care Res*. 2019; 71 (3): 413-8.
- Gumenyuk LN, Kabatova IN. Osobennosti kachestva zhizni bol'nykh yuvenil'nym revmatoidnym artritom na sanatorno-kurortnom lechenii. *Tavricheskii mediko-biologicheskii vestnik*. 2017; 20 (2): 32-35. Russian.
- Raghavendra VV, Singh AV, Shaji H Vohra, Kulkarni SK, Agrewala JN. Melatonin provides signal 3 to unprimed CD4(+) T cells but failed to stimulate LPS primed B cells. *Clin Exp Immunol*. 2001; 124: 414-22.
- Fedorov ES, Salugina SO, Kuzmina NN. Rol' citokinovoy seti v regulatsii vospaleniya pri razlichnykh variantakh yuvenil'nogo artrita. 2009; 3: 74-89. Russian.
- Belyaeva LM, Chizhevskaya ID, Filonovich RM, i dr. Sovremennye podkhody k terapii revmaticheskikh bolezney u detej. *Mezhdunarodnyy zhurnal pediatrii, akusherstva i ginekologii*. 2013; 3 (3): 25-34. Russian.
- Kabatova IN. Sostoyanie gormonal'nogo komponenta adaptatsii u detej s yuvenil'nym revmatoidnym artritom. *Tavricheskii mediko-biologicheskii vestnik*. 2017; 20 (3): 43-48. Russian.
- Skoromnaya NN. Rol' ehpifizarnogo gormona melatonina v regulatsii razlichnykh zven'ev ehndokrinnoy sistemy u bol'nykh yuvenil'nym revmatoidnym artritom. *Zdorov'e rebenka*. 2012; 8 (43): 65-70. Russian.
- Qian X, Liu YX, Ye X, et al. Gut microbiota in children with juvenile idiopathic arthritis: characteristics, biomarker identification, and usefulness in clinical prediction. *BMC Genomics*. 2020; 21: 286.
- Di Paola M, Cavalieri D, Albanese D, et al. Alteration of fecal microbiota profiles in juvenile idiopathic arthritis. Associations with HLA-B27 allele and disease status. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1703.
- Tejesvi MV, Arvonen M, Kangas SM, et al. Faecal microbiome in new-onset juvenile idiopathic arthritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016; 35 (3): 363-70.
- Zhang X, Zhang D, Jia H, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med*. 2015; 21 (8): 895-905.
- Pianta A, Arvikar S, Strle K, et al. Evidence of the immune relevance of *Prevotella copri*, a gut microbe, in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2017; 69 (5): 964-75.
- Manfredo Vieira S, Hiltensperger M, Kumar V, et al. Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. *Science*. 2018; 359 (6380): 1156-61.
- Berntson L. A pilot study of possible anti-inflammatory effects of the specific carbohydrate diet in children with juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2021; 19 (1): 88.
- Ashworth A. Nutrition, food security, and health. In: Kliegman RM, Stanton BF, St Geme III JW, Schor NF, editors. *Nelson textbook of pediatrics*. 20th ed. New York: Elsevier, 2015.
- Gahagan S. Overweight and obesity. In: Kliegman RM, Stanton BF, St Geme III JW, Schor NF, editors. *Nelson textbook of pediatrics*. 20th ed. New York: Elsevier, 2015; 307-16.
- Petty RE, Southwood TR, Manners P, et al. International League of Associations for Rheumatology. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol*. 2004; 31: 390-2.
- Smolen JS, Breedveld FC, Eberl G, et al. Validity and reliability of the twenty-eight-joint count for the assessment of rheumatoid arthritis activity. *Arthritis Rheum*. 1995; 38: 38-43.
- Mitra S, Forster-Fromme K, Damms-Machado A, et al. Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics*. 2013; 14 (5): 16.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010; 7 (5): 335-6.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72: 5069-72.
- Ritari J, Salojärvi J, Lahti L, de Vos WM. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. *BMC Genomics*. 2015; 16 (1): 1056.
- Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients*. 2011; 3 (10): 858-76.
- Stoll ML, Weiss PF, Weiss JE, et al. Age and fecal microbial strain-specific differences in patients with spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2018; 20 (1): 14.
- Breban M, Tap J, Leboime A, et al. Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76 (9): 1614-22.
- Tito RY, Cypers H, Joossens M, et al. Brief report: dialister as a microbial marker of disease activity in Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2017; 69 (1): 114-21.
- Sanna S, van Zuydam NR, Mahajan A, et al. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat Genet*. 2019; 51 (4): 600-5.
- Michels N, Van de Wiele T, Fouhy F, et al. Gut microbiome patterns depending on children's psychosocial stress: Reports versus biomarkers. *Brain Behav Immun*. 2019; 80: 751-62.
- Rosin S, Xia K, Azcarate-Peril MA, et al. A preliminary study of gut microbiome variation and HPA axis reactivity in healthy infants. *Psychoneuroendocrinology*. 2021; 124: 105046.
- Dalile B, Vervliet B, Bergonzelli G, et al. Colon-delivered short-chain fatty acids attenuate the cortisol response to psychosocial stress in healthy men: a randomized, placebo-controlled trial. *Neuropsychopharmacol*. 2020; 45: 2257-66.
- Van de Wouw M, Boehme M, Lyte JM, et al. Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain-gut axis alterations. *J Appl Physiol*. 2018; 596: 4923-44.
- Ziegler DR, Herman JP. Neurocircuitry of stress integration: anatomical pathways regulating the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis of the rat. *Integr Comp Biol*. 2002; 42: 541-51.
- Song L, He M, Sun Q, et al. Roseburia hominis Increases Intestinal Melatonin Level by Activating p-CREB-AANAT Pathway. *Nutrients*. 2022; 14: 117.
- Huang X, Qiu Y, Gao Y, et al. Gut microbiota mediate melatonin signalling in association with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2022; 65 (10): 1627-41.
- Henke MT, Kenny DJ, Cassilly CD, et al. *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci*. 2019; 116: 12672-7.

## МУТАЦИОННЫЕ ОСНОВЫ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К МЕРОПЕНЕМУ У *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

И. В. Чеботарь ✉, Ю. А. Бочарова, А. В. Чаплин, Т. А. Савинова, Ю. А. Василиадис, Н. А. Маянский

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

Резистентные к карбапенемам штаммы *Pseudomonas aeruginosa* рассматриваются в качестве критически опасных патогенов первого уровня приоритета. Расшифровка механизмов формирования устойчивости к карбапенемам является актуальной задачей современной медицинской науки. Целью работы было описать разнообразие и закрепление мутаций, ассоциированных с формированием карбапенемрезистентности в процессе адаптации *P. aeruginosa* к повышающимся концентрациям меропенема. Объектами исследования были изоляты *P. aeruginosa*, полученные при росте референтного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 в градиенте возрастающих концентраций меропенема. Оценку чувствительности изолятов к меропенему выполняли при помощи е-тестов (эпсилонметрический метод) с меропенемом и при помощи метода диффузии антибиотика в агаре. Геномы изолятов были секвенированы на полногеномном секвенаторе MGISEQ-2000. Полученные результаты показали, что формирование высоких уровней резистентности к меропенему у *P. aeruginosa* в эксперименте происходит в короткие сроки (6 суток). Эволюция резистентности сопряжена с процессом клонирования, при котором происходит возникновение множества клонов с различными генотипами. Основой клонирования является мутагенез, в который вовлечены 11 генов, включая *oprD*, *pbuE*, *nalD*, *nalC*, *spoT*, *mlaA*, *mexD*, *mexR*, *oprM*, *mraY*, *pbp3*. Часть образовавшихся клонов, независимо от уровня их резистентности к меропенему, не получают прогрессивного развития и вытесняются более успешными клонами.

**Ключевые слова:** антибиотики, резистентность, *Pseudomonas aeruginosa*, меропенем, мутации

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-15-00235).

**Благодарности:** авторы благодарят Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава РФ за консультации по методической части исследования.

**Вклад авторов:** И. В. Чеботарь — концептуализация, подготовка рукописи; Ю. А. Бочарова — методология, формальный анализ; А. В. Чаплин — формальный анализ данных секвенирования; Т. А. Савинова — формальный анализ данных секвенирования; Ю. А. Василиадис — методология, выполнение секвенирования; Н. А. Маянский — концептуализация, редактирование рукописи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование выполнено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации и норм работ с условно-патогенными организмами.

✉ **Для корреспонденции:** Игорь Викторович Чеботарь  
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия: nizarnn@yandex.ru

**Статья получена:** 25.11.2022 **Статья принята к печати:** 11.12.2022 **Опубликована онлайн:** 28.12.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.063

## MUTATIONAL BASIS OF MEROPENEM RESISTANCE IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Chebotar IV ✉, Bocharova YuA, Chaplin AV, Savinova TA, Vasiliadis YuA, Mayansky NA

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The carbapenem-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* are considered as the dangerous pathogens of critical priority. Deciphering the mechanisms underlying the development of carbapenem resistance is an urgent challenge faced by modern medical science. The study was aimed to describe the diversity and fixation of mutations associated with the development of carbapenem resistance during the *P. aeruginosa* adaptation to the increasing meropenem concentrations. The objects of the study were *P. aeruginosa* isolates obtained by growing the ATCC 27853 *P. aeruginosa* reference strain exposed to increasing concentrations of meropenem. The isolates were tested for meropenem susceptibility using E-tests (Epsilonometer tests) and by the agar dilution method. Genomes of the isolates were sequenced in the MGISEQ-2000 whole-genome sequencer. The findings show that in experimental settings *P. aeruginosa* develops high meropenem resistance very quickly (in 6 days). Evolution of resistance is associated with cloning involving the emergence of multiple clones with various genotypes. Mutagenesis that involves 11 genes, including *oprD*, *pbuE*, *nalD*, *nalC*, *spoT*, *mlaA*, *mexD*, *mexR*, *oprM*, *mraY*, *pbp3*, provides the basis for cloning. Regardless of the levels of their meropenem resistance, some of the emerging clones do not progressively develop and are replaced by more successful clones.

**Keywords:** antibiotics, resistance, *Pseudomonas aeruginosa*, meropenem, mutation

**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation (project No. 20-15-00235).

**Acknowledgements:** the authors thank the Center of Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine of the Pirogov Russian National Research Medical University for their advice on the research methods.

**Author contribution:** Chebotar IV — concept, manuscript writing; Bocharova YuA — methods, formal analysis; Chaplin AV — formal analysis of sequencing data; Savinova TA — formal analysis of sequencing data; Vasiliadis YuA — methods, sequencing; Mayansky NA — concept, manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was performed in full compliance with the principles of the Declaration of Helsinki and the standards for handling opportunistic pathogens.

✉ **Correspondence should be addressed:** Igor V. Chebotar  
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia: nizarnn@yandex.ru

**Received:** 25.11.2022 **Accepted:** 11.12.2022 **Published online:** 28.12.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.063

*Pseudomonas aeruginosa* является одним из ключевых оппортунистических патогенов [1]. Особую угрозу для пациентов несут карбапенемрезистентные штаммы *P. aeruginosa*, именно поэтому они были включены в Лист приоритета ВОЗ («WHO priority list for R&D of new

antibiotics for antibiotic-resistant bacteria») в качестве критически опасных патогенов первого уровня приоритета [2]. Карбапенемрезистентность может формироваться двумя путями. Первый путь реализуется за счет приобретения генов резистентности из внешних



источников путем горизонтального переноса. Этот механизм устойчивости, часто называемый «plasmid-borne resistance», обеспечивает высокие уровни резистентности, и его изучение более популярно среди исследователей. Главной молекулярной основой карбапенемрезистентности, передаваемой горизонтально, являются энзимы — разнородные бета-лактамазы разных Ambler классов, объединенные по функциональному принципу в группу карбапенемаз. Однако существует и второй тип формирования карбапенемрезистентности, не связанный с горизонтальной передачей генов. Он базируется на уникальном адаптационном потенциале *P. aeruginosa* и реализуется за счет мутационной изменчивости хромосомных генов [3]. Среди клинических изолятов наиболее яркие примеры мутационной антибиотикорезистентности демонстрируют штаммы *P. aeruginosa*, выделенные у пациентов с муковисцидозом. Описаны высокорезистентные штаммы, имеющие более 60 поврежденных мутациями генов, которые могут быть причиной формирования устойчивости к разным классам антибиотиков [4]. Из них 26 мутировавших генов могли быть причиной карбапенемрезистентности.

Исследование разнообразия мутаций, возникающих в процессе адаптации *P. aeruginosa* к карбапенемам, представляет интерес для прогнозирования эволюции карбапенемрезистентности среди клинических изолятов. Механизмы мутационной карбапенемрезистентности анализируют при помощи двух методологических подходов: 1) изучения генетических и фенотипических свойств клинических карбапенемрезистентных изолятов; 2) направленного моделирования карбапенемрезистентности *in vitro* при контакте *P. aeruginosa* с антибиотиком.

Цель настоящей работы — описать разнообразие и закрепление мутаций, ассоциированных с формированием карбапенемрезистентности в процессе адаптации *P. aeruginosa* к повышающимся концентрациям меропенема.

Чаще направленное получение резистентных штаммов *P. aeruginosa* моделируют при помощи серии последовательных трансферов бактерий в жидких питательных средах, содержащих антибиотик в восходящей концентрации от 0 мкг/мл до концентраций, превосходящих минимальные ингибирующие концентрации (МИК) в десятки и сотни раз [5]. Мы использовали другую модель [6], которая базировалась на эволюции подвижных бактерий в градиенте повышающихся концентраций антибиотика. Такой подход позволяет изолировать большее количество клонов с различными генотипами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил референсный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, который используют в качестве стандарта чувствительности к карбапенемам (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 12.0. Available at: [www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

Исследование проводили на основе пространственно-временной модели формирования резистентности подвижных бактерий к антибиотикам, методика которой подробно описана ранее [7]. В емкости размером 20,0 × 40,0 см создавали пять разделенных перегородками отсеков глубиной 2,0 см и заполняли их плотной питательной средой на основе бульона Лурее–Бертани (LB Miller, Becton Dickinson and Co.; США). Среда в отсеках содержала меропенем (Supelco® Analytical Products, Merck

& Co. Inc.; США) в последовательных концентрациях 0, 0,2, 20, 200, 2000 мкг/мл. Поверх отсеков настилали единый слой не содержащей меропенема плотной питательной среды (высота примерно 0,6 см) на основе бульона Лурее–Бертани. Сверху настилали слой полужидкого агара (содержание агара 0,28%) на основе бульона Лурее–Бертани без меропенема, высота слоя составляла примерно 0,8 см. Перед началом эксперимента культуру *P. aeruginosa* адаптировали к полужидкой питательной среде по ранее описанной методике [7].

Для посева использовали суспензию бактерий, стандартизованную по оптической плотности до 0,5 ед. по МакФарланду. Посев производили путем укола в полужидкий агар на глубину примерно 1–2 мм в секторе А (рис. 1).

Каждые 24 ч с фронта распространения *P. aeruginosa* отбирали образцы и пересеивали на агар Мюллера–Хинтона (Becton Dickinson and Co., США) для накопления биоматериала с целью последующего изучения фенотипических свойств (профиль антибиотикорезистентности) и изменений бактериального генома.

Оценку чувствительности изолятов к меропенему выполняли путем определения МИК двумя способами: 1) при помощи е-тестов (эпидиометрический метод) с меропенемом согласно рекомендациям фирмы-изготовителя (BioMérieux SA; Франция); 2) при помощи метода диффузии антибиотика в агаре [8]. Значения МИК не интерпретировали с клинических позиций и проанализировали исключительно с позиций их динамики.

Через 240 ч после начала эксперимента оценивали остаточную концентрацию меропенема в полужидком агаре методом ВЭЖХ по известной методике [9].

Бактериальную ДНК выделяли из суточных культур изолятов *P. aeruginosa*, выращенных на агаре Мюллера–Хинтона (Becton Dickinson and Co., США), с использованием наборов QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen; Германия) по протоколу фирмы-производителя. Образцы ДНК хранили при –20 °С. Для подготовки библиотек геномной ДНК применяли ультразвуковую фрагментацию (Covaris; США) бактериальной ДНК (400 нг) с последующей репарацией концевых последовательностей и лигированием адаптеров MGI Tech, Китай). Для очистки ДНК-библиотек использовали магнитные частицы Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США). Концентрацию бактериальной ДНК и ДНК-библиотек измеряли при помощи прибора Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific; США). Полногеномное секвенирование осуществляли на платформе MGISEQ-2000 (MGI Tech, Китай). Длина прочтений составляла 250 пар оснований. Оценку качества проводили с использованием программ FASTQC (Babraham Institute; Великобритания) и Trimmomatic v.0.38 (Usadel Lab; США). Сборку геномов *de novo* осуществляли с использованием программы SPAdes 3.14 [10]. Для контроля полноты сборки и исключения возможности контаминации использовали веб-сервер ContEst16S. Качество сборки оценивали при помощи QUAST 5.0 [11]. Геномы аннотировали с помощью сервера RAST [12] и программы Prokka [13].

Для детекции однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) осуществляли картирование коротких ридов на референс при помощи программы Snippy [14]. В качестве референсного генома использовали геном «нулевого» изолята, т. е. изолята, который был получен после адаптации штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 к полужидкому агару и который использовали для старта эксперимента. Для аннотации выявленных вариантов и

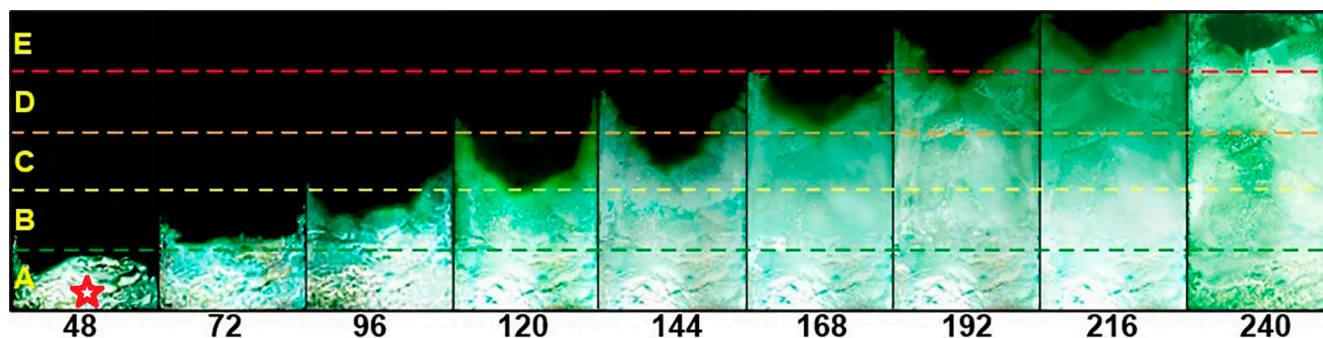


Рис. 1. Динамика распространения *P. aeruginosa* по поверхности полужидкого агара в градиенте повышающейся концентрации меропенема. Фотографии получены на сроках культивирования 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 ч от начала эксперимента. Штриховые линии — границы, разделяющие секторы А, В, С, D, Е с различными концентрациями меропенема (0, 0,2, 20, 200, 2000 мкг/мл соответственно) в нижнем слое плотной питательной среды (см. раздел «Материалы и методы»). Звездочка — точка старта (внесения культуры *P. aeruginosa* ATCC 27853)

предсказания их влияния на гены применяли программу SnpEff [15].

При помощи инструментов BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) в геномах всех полученных изолятов были проанализированы гены и последовательности аминокислот в их продуктах. Для анализа детерминант резистентности использовали также сервисы ResFinder и алгоритм AMRFinderPlus, входящий в NCBI Pathogen Detection pipeline [16, 17].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамика продвижения *P. aeruginosa* по поверхности полужидкого агара в направлении повышения концентрации меропенема показана на рис. 1. За 168 ч (7 суток) граница роста *P. aeruginosa* достигла зоны с максимальной концентрацией меропенема, в течение 240 ч (10 суток) был получен рост на всей площади питательной среды. Концентрация меропенема в секторе Е полужидкого агара (рис. 1) в конце эксперимента составляла 56 мкг/мл.

В ходе эксперимента с фронта распространения *P. aeruginosa* было отобрано 92 изолята. Уровни резистентности к меропенему изолятов росли по мере продвижения бактерий в направлении увеличения концентрации меропенема (рис. 2). Повышение МИК от 0,5 мкг/мл до 2, 4 и 8 мкг/мл наблюдалось уже через 72 ч от начала эксперимента. Изоляты с МИК = 16 мкг/мл и МИК = 32 мкг/мл появлялись через 144 ч, МИК = 64 мкг/мл — через 216 ч. МИК меропенема > 8 мкг/мл был зарегистрирован у 61 изолята, МИК ≥ 32 — у 45 изолятов.

Несинонимичные мутации были выявлены в 11 генах, включая *oprD*, *pbuE*, *nalD*, *nalC*, *spoT*, *miaA*, *mexD*, *mexR*, *oprM*, *mraY*, *pbp3*. В четырех из 92 (4,3%) геномов мутации в этих генах не были обнаружены, данные геномы принадлежали изолятам, полученным в первые 48 ч роста. В остальных 88 из 92 (95,7%) геномов были обнаружены различные комбинации поврежденных мутациями генов (табл. 1). Наиболее часто повреждались гены *oprD*, *pbuE*, *nalD* (табл. 2). Мутации в генах *nalD*, *spoT*, *miaA*, *mexR*, *mraY*, *pbp3* ассоциировались с высокими уровнями резистентности несущих их изолятов, МИК меропенема которых был >8 мкг/мл (табл. 2). Мутации в гене *oprM*, напротив, были обнаружены лишь у четырех из 92 (4,3%) штаммов с МИК меропенема < 8 мкг/мл. Среди 84 штаммов с мутациями *oprD* было найдено четыре высоко чувствительных изолята с МИК меропенема от 0,5 до 2 мкг/мл. У этих изолятов *oprD*-мутации в трех случаях приводили к заменам L292Q, L252P, G307D и в одном случае — к преждевременному обрыву синтеза белка

(W138stop). Наиболее распространенным был генотип с сочетанием мутаций в генах *oprD*, *pbuE*, *nalD* (табл. 1).

Динамика появления мутаций на разных сроках отбора материала представлена в табл. 2. Самыми первыми стойкие мутационные изменения возникали в генах *oprD* и *pbuE* через 72 ч от начала эксперимента. Мутация в гене *pbuE*, приводящая к замене A261D, была представлена единственным вариантом и равномерно сочеталась с различными вариантами других мутаций у 77 из 92 (83,7%) изолятов. Мутации в гене *oprD* были представлены девятью вариантами. Однако у большинства изолятов с мутациями в *oprD* (73 из 84; 86,9%) были найдены только два варианта мутаций, приводящих к заменам G307D (*oprD*-G307D) и L238P (*oprD*-L238P). Другие семь вариантов *oprD*-мутаций были относительно редкими и обнаружены у 11 из 84 (13,1%) изолятов с мутированными *oprD*-генами. Таким образом, первоначальный штамм разделился на два клона — *oprD*-G307D и *oprD*-L238P (рис. 2). Штамм, являющийся прямым родоначальником клона *oprD*-G307D, появился через 96 ч

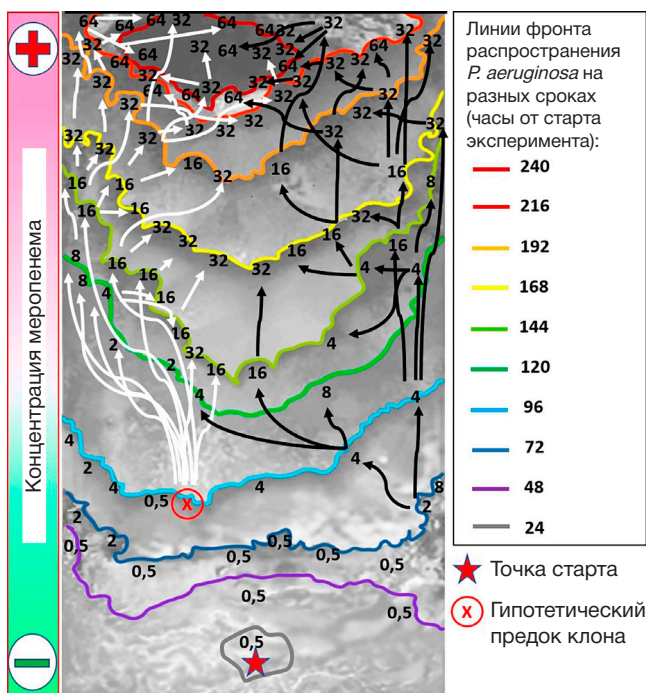


Рис. 2. Топология клонов *P. aeruginosa* на поверхности полужидкого агара в градиенте повышающейся концентрации меропенема через 240 ч культивирования. Цифрами даны МИК меропенема (мкг/мл) изолятов, отобранных в месте расположения цифры. Белыми стрелками показано распространение клона *oprD*-L238P, черными — распространение клона *oprD*-G307D



Таблица 1. Гены и сочетания генов, в которых были обнаружены несинонимические мутации

№	Комбинации генов с мутациями	Число штаммов (% от всех штаммов, $n = 92$ )
1	<i>oprD, pbuE, nalD</i>	20 (22,2)
2	<i>oprD, pbuE</i>	11 (12,0)
3	<i>oprD, pbuE, nalD, spoT</i>	10 (10,9)
4	<i>oprD, pbuE, nalD, mlaA</i>	11 (12,0)
5	<i>oprD, pbuE, mexD</i>	9 (10)
6	<i>oprD</i>	6 (7)
7	<i>oprD, pbuE, spoT</i>	4 (4)
8	<i>oprD, pbuE, mexR</i>	3 (3)
9	<i>pbuE</i>	3 (3)
10	<i>oprD, nalD</i>	2 (2)
11	<i>oprD, pbuE, mexR, mraY</i>	2 (2)
12	<i>oprD, oprM</i>	2 (2)
13	<i>oprM</i>	1 (1)
14	<i>oprD, nalC, pbuE</i>	1 (1)
15	<i>oprD, pbuE, oprM</i>	1 (1)
16	<i>oprD, pbuE, spoT, mexD</i>	1 (1)
17	<i>oprD, pbuE, pbp3</i>	1 (1)
18	отсутствие мутаций	4 (4)

эксперимента и имел МИК = 2 мкг/мл меропенема. Штамм, являющийся прямым родоначальником клона *oprD*-L238P, не был изолирован в ходе эксперимента, гипотетически он появился на сроках до 120 ч от начала эксперимента. Эволюция главных клонов *oprD*-G307D и *oprD*-L238P была связана с уменьшением их чувствительности к меропенему (рис. 2) и накоплением мутаций в других генах, значимых для развития карбапенемрезистентности.

Начиная с 144 ч эксперимента среди штаммов клона *oprD*-G307D появились изоляты с мутацией в гене *nalD*, приводящей к замене G172D. К концу эксперимента 14 из 34 штаммов клона *oprD*-G307D являлись носителями этой мутации.

Клон *oprD*-L238P был связан с другими мутациями в гене *nalD*, приводящими к заменам T11N (24 из 39 изолятов клона) и H56P (4 из 39 изолятов клона). Делеция в гене *mlaA* (5 п.о. del (423–427 нуклеотиды)), приводящая к сдвигу рамки считывания, тоже присутствовала только у изолятов (11 из 39) из клона *oprD*-L238P. Во всех случаях делеция в гене *mlaA* сочеталась с наличием T11N-мутации в гене *nalD*.

Мутации в генах *mexR*, *oprM*, *mraY*, *pbp3*, *nalC* были обнаружены у единичных изолятов.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обсуждая фенотипические признаки адаптации *P. aeruginosa* к меропенему, следует акцентировать внимание на скорости формирования резистентности. Уже через шесть суток уровни резистентности отдельных изолятов, полученных на этом сроке, достигали МИК = 32 мкг/мл меропенема. Максимальные значения МИК меропенема составляли 64 мкг/мл и в 128 раз превышали значения МИК, которые регистрировали у изолятов, полученных в первые 48 ч эксперимента. Факт обнаружения изолятов с МИК = 32 мкг/мл в зоне с фактическим содержанием меропенема 56 мкг/мл можно объяснить различием между условиями определения МИК референсными способами (эпидемиологическим методом и методом диффузии в агаре) и условиями эксперимента (питательная среда, время культивирования).

Таблица 2. Фенотипы резистентности *P. aeruginosa* к меропенему и гены с мутациями, которые могут детерминировать устойчивость к карбапенемам

№	Ген	Время появления мутации (в часах от старта)	Число штаммов (% от группы) с мутациями в группах с различными МИК меропенема (мкг/мл)			Число штаммов с мутациями (% от всех штаммов, $n = 92$ )
			$\leq 8$ , $n = 31$	$> 8 < 32$ , $n = 16$	$\geq 32$ , $n = 45$	
1	<i>oprD</i>	72	23 (74,2)	16 (100)	45 (100)	84 (91,3)
2	<i>pbuE</i>	72	16 (51,6)	16 (100)	45 (100)	77 (83,7)
3	<i>nalD</i>	120	1 (3)	12 (75)	30 (66,7)	43 (46,7)
4	<i>spoT</i>	192	0 (0)	1 (6)	14 (31,1)	15 (16,3)
5	<i>mlaA</i>	144	0 (0)	1 (6)	10 (22,2)	11 (12,0)
6	<i>mexD</i>	120	3 (10)	3 (29)	4 (9)	10 (10,9)
7	<i>mexR</i>	144	0 (0)	2 (13)	3 (7)	5 (5)
8	<i>oprM</i>	72	4 (13)	0 (0)	0 (0)	4 (4)
9	<i>mraY</i>	168	0 (0)	0 (0)	2 (4)	2 (2)
10	<i>pbp3</i>	144	0 (0)	0 (0)	1 (2)	1 (1)
11	<i>nalC</i>	72	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Возникновение мутаций в генах было зарегистрировано одновременно с ростом МИК меропенема у отдельных штаммов на сроке 72 ч. На всем протяжении эксперимента было найдено 11 подвергшихся мутациям генов. Из них только для генов *oprD*, *nalC*, *nalD*, *mexD*, *mexR* и *pbp3* ранее были доказаны связи с карбапенемрезистентностью [18–21]. О роли генов *oprM*, *pbuE*, *spoT*, *mraY*, *mlaA* в формировании антибиотикорезистентности ранее не сообщалось, что не исключает их косвенного влияния на процесс адаптации к карбапенемам.

Рассматривая мутационную картину в целом, следует обратить внимание на феномен клонирования. На сроках 72–96 ч возникли две главные клональные линии. Все представители одной из них несли мутацию в гене *oprD*, приводящую к замене G307D. У всех представителей другой линии мутация в *oprD* приводила к замене L238P. Внутри сформировавшихся клонов возникали и частично закреплялись новые мутации, которые вели к росту фенотипического уровня устойчивости к меропенему. Наряду с этими линиями возникали единичные клоны с другими мутациями *oprD*, которые не демонстрировали прогрессивного распространения, хотя у некоторых из них МИК меропенема был выше, чем у окружающих представителей *oprD*-G307D и *oprD*-L238P клонов (рис. 2). Вероятно, мутации у неуспешных, но высокорезистентных клонов были фактором, негативно влияющим на итоги внутривидовой конкуренции. Следует отметить, что повреждение *oprD* у меропенемрезистентных изолятов *P. aeruginosa* наблюдается не только в эксперименте. Так, пять из шести высокорезистентных (МИК > 32 мкг/мл) к меропенему штаммов *P. aeruginosa*, обнаруженных при муковисцидозе и не продуцирующих карбапенемазы, несли мутации в генах *oprD* [4]. Вместе с тем, поломки одного гена *oprD* недостаточно для формирования резистентности к

меропенему. Даже штамм с нонсенс-мутацией (стоп-кодон W138stop) в гене *oprD* сохранял высокую чувствительность к меропенему. Для формирования устойчивости необходима аккумуляция хромосомных мутаций во многих хромосомных генах, прямо или косвенно влияющих на чувствительность к антибиотикам.

Мы не исключаем того, что некоторые изоляты с уникальным генотипом не были отобраны в ходе эксперимента и информация о них была утрачена. Примером этого служит неясность в отношении родоначальника клона *oprD*-L238P, являющегося промежуточным звеном между высокочувствительными и высокорезистентными штаммами. Однако в отличие от эволюции в жидкой среде пространственно-временное моделирование резистентности позволяет изолировать большее число клонов и избежать потери информации о возможных мутациях, приводящих к резистентности.

## ВЫВОДЫ

Формирование высоких уровней резистентности к меропенему у *P. aeruginosa* в эксперименте происходит в короткие сроки (6 суток). Эволюция резистентности сопряжена с процессом клонирования, при котором происходит возникновение множества клонов с различными генотипами. Основой клонирования является мутагенез, в который вовлечены 11 генов, включая *oprD*, *pbuE*, *nalD*, *nalC*, *spoT*, *mlaA*, *mexD*, *mexR*, *oprM*, *mraY*, *pbp3*. Часть образовавшихся клонов, независимо от уровня их резистентности к меропенему, не получают прогрессивного развития и вытесняются более успешными клонами. Использованная в эксперименте модель является удобным инструментом для получения набора вариантов с разными генотипами резистентности.

## Литература

1. Лазарева А. В., Чеботарь И. В., Крыжановская О. А., Чеботарь В. И., Маянский Н. А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. Клин Микробиол Антимикроб Химиотер. 2015; 17 (3): 170–86.
2. WHO priority list for research and development of new antibiotics for antibiotic-resistant bacteria. Geneva: World Health Organization, 2017. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed September 1, 2012).
3. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resistance Updates. 2015; 21: 41–59. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>.
4. López-Causapé C, Sommer LM, Cabot G, Rubio R, Ocampo-Sosa AA, Johansen H et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international cystic fibrosis clone. Sci Rep. 2017; 7: 5555. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05621-5>.
5. Barbosa C, Trebosc V, Kemmer C, Rosenstiel P, Beardmore R, Schultenburg H, et al. Alternative evolutionary paths to bacterial antibiotic resistance cause distinct collateral effects. Mol Biol Evol. 2017; 34 (9): 2229–44. Available from: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx158>.
6. Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, Chait R, Gross R, Yelin I, et al. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. Science. 2016; 353 (6304): 1147–51. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>.
7. Savinova TA, Bocharova YA, Chaplin AV, Korostin DO, Shamina OV, Mayanskiy NA, et al. Meropenem-induced reduction in colistin susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 27853. Bulletin of RSMU. 2022; 1: 30–4. Available from: <https://doi.org/10.24075/brsmu.2022.001>.
8. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. Clin Microbiol Infect. 2000; 6 (9): 509–15. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>.
9. Казанова А. М., Степанова Е. С., Макаренкова Л. М., Чистяков В. В., Зырянов С. К., Сенченко С. П.. Разработка и валидация методики количественного определения меропенема в плазме крови для терапевтического лекарственного мониторинга. Химико-фармацевтический журнал. 2020; 54 (4): 56–60. Available from: <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2020-54-4-56-60>.
10. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012; 19: 455–77. Available from: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
11. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics. 2013; 29 (8): 1072–5. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
12. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Res. 2014; 42:

- D206–14. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.
13. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014; 30 (14): 2068–9. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
  14. Seemann T. 2015. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. GitHub. Available at: <https://github.com/tseemann/snippy> (accessed November 2022).
  15. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*. 2012; 6 (2): 80–92. Available from: <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.
  16. Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Cech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46 (W1): W537–44. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>.
  17. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2020; 75 (12): 3491–500. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
  18. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*. 2012; 302 (2): 63–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001>.
  19. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22 (4): 582–610. Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>.
  20. Srikumar R, Kon T, Gotoh N, Poole K. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42 (1): 65–71. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.65>.
  21. Glen KA, Lamont IL.  $\beta$ -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens*. 2021; 10 (12): 1638. Available from: <https://doi.org/10.3390/pathogens10121638>.

## References

1. Lazareva AV, Chebotar IV, Kryzhanovskaya OA, Chebotar VI, Mayanskiy NA. *Pseudomonas aeruginosa*: patogennost', patogenez i patologiya. *Klin Mikrobiol Antimikrob Ximioter*. 2015; 17 (3): 170–86. Russian.
2. WHO priority list for research and development of new antibiotics for antibiotic-resistant bacteria. Geneva: World Health Organization, 2017. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed September 1, 2012).
3. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*. 2015; 21: 41–59. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>.
4. López-Causapé C, Sommer LM, Cabot G, Rubio R, Ocampo-Sosa AA, Johansen H et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistance in an international cystic fibrosis clone. *Sci Rep*. 2017; 7: 5555. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05621-5>.
5. Barbosa C, Trebosc V, Kemmer C, Rosenstiel P, Beardmore R, Schlenburg H, et al. Alternative evolutionary paths to bacterial antibiotic resistance cause distinct collateral effects. *Mol Biol Evol*. 2017; 34 (9): 2229–44. Available from: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx158>.
6. Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, Chait R, Gross R, Yelin I, et al. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science*. 2016; 353 (6304): 1147–51. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>.
7. Savinova TA, Bocharova YA, Chaplin AV, Korostin DO, Shamina OV, Mayanskiy NA, et al. Meropenem-induced reduction in colistin susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 27853. *Bulletin of RSMU*. 2022; 1: 30–4. Available from: <https://doi.org/10.24075/brsmu.2022.001>.
8. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect*. 2000; 6 (9): 509–15. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>.
9. Kazanova AM, Stepanova ES, Makarenkova LM, Chistyakov VV, Zyryanov SK, Senchenko SP. Razrabotka i validaciya metodiki kolichestvennogo opredeleniya meropenema v plazme krovi dlya terapevticheskogo lekarstvennogo monitoringa. *Ximiko-farmaceuticheskij zhurnal*. 2020; 54 (4): 56–60. Available from: <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2020-54-4-56-60>. Russian.
10. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012; 19: 455–77. Available from: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
11. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013; 29 (8): 1072–5. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
12. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res*. 2014; 42: D206–14. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.
13. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014; 30 (14): 2068–9. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
14. Seemann T. 2015. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. GitHub. Available at: <https://github.com/tseemann/snippy> (accessed November 2022).
15. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*. 2012; 6 (2): 80–92. Available from: <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.
16. Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Cech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46 (W1): W537–44. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>.
17. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2020; 75 (12): 3491–500. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
18. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*. 2012; 302 (2): 63–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001>.
19. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22 (4): 582–610. Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>.
20. Srikumar R, Kon T, Gotoh N, Poole K. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42 (1): 65–71. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.65>.
21. Glen KA, Lamont IL.  $\beta$ -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens*. 2021; 10 (12): 1638. Available from: <https://doi.org/10.3390/pathogens10121638>.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМОЙ СИГНАТУРЫ ДНК-МЕТИЛИРОВАНИЯ У ПАЦИЕНТОК С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А. И. Калинин<sup>1</sup>✉, В. О. Сигин<sup>1</sup>, М. В. Немцова<sup>1,2</sup>, В. В. Стрельников<sup>1,3</sup><sup>1</sup> Медико-генетический научный центр имени Н. П. Бочкова, Москва, Россия<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия<sup>3</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Рак молочной железы (РМЖ) — наиболее часто диагностируемое онкологическое заболевание и одна из ведущих причин смертности среди женского населения. Разработка прогностических моделей с использованием мультиомиксных данных является главной целью прецизионной онкологии. Аберрантное метилирование ДНК в РМЖ представляет собой информативный маркер канцерогенеза. Несмотря на существующие факторы прогноза РМЖ, введение маркеров метилирования позволит получать более точную прогностическую оценку. Целью работы было изучить сигнатуры метилирования ДНК в различных подтипах РМЖ для клинических конечных точек и клинико-патологических характеристик пациенток. Данные об уровнях метилирования CpG-динуклеотидов (зондов) и клинические характеристики образцов РМЖ были получены из базы данных The Cancer Genome Atlas Breast Cancer. С помощью метода одномерной регрессии Кокса были выбраны CpG-динуклеотиды, ассоциированные с выбранными конечными точками. Методом LASSO осуществляли поиск стабильных зондов, а дальнейшее построение сигнатур и независимость клинических характеристик выполняли с помощью многофакторной регрессии Кокса. Диагностический и прогностический потенциал сигнатур оценивали с помощью метода ROC-анализа и кривых Каплан–Майера. Показано, что сигнатуры отобранных зондов обладают значимым диагностическим (AUC от 0,76 до 1) и прогностическим ( $p < 0,05$ ) потенциалом. С помощью данного подхода удалось идентифицировать 47 генов, связанных с хорошим и плохим прогнозом, из которых пять уже были описаны ранее. При наличии результатов широкогеномного анализа ДНК примененный исследовательский подход можно использовать для изучения не только молекулярного патогенеза РМЖ, но и для других заболеваний.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, молекулярные подтипы, выживаемость, метилирование ДНК, прогностические маркеры

**Финансирование:** работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (соглашение № 075-15-2021-1073).

**Вклад авторов:** А. И. Калинин — дизайн исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, написание статьи; В. О. Сигин — написание статьи; М. В. Немцова — концепция и дизайн исследования; В. В. Стрельников — концепция и дизайн исследования, научное редактирование.

✉ Для корреспонденции: Алексей Игоревич Калинин  
ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115522; alexeika2@yandex.ru

**Статья получена:** 18.10.2022 **Статья принята к печати:** 11.11.2022 **Опубликована онлайн:** 25.11.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.056

## IDENTIFICATION OF PROGNOSTICALLY SIGNIFICANT DNA METHYLATION SIGNATURES IN PATIENTS WITH VARIOUS BREAST CANCER TYPES

Kalinkin AI<sup>1</sup>✉, Sigin VO<sup>1</sup>, Nemtsova MV<sup>1,2</sup>, Strelnikov VV<sup>1,3</sup><sup>1</sup> Research Centre of Medical Genetics, Moscow, Russia<sup>2</sup> Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia<sup>3</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Breast cancer (BC) is the most frequently diagnosed cancer and one of the major causes of female mortality. The development of prognostic models based on multiomics data is the main goal of precision oncology. Aberrant DNA methylation in BC is a diagnostic marker of carcinogenesis. Despite the existing factors of BC prognosis, introduction of methylation markers would make it possible to obtain more accurate prognostic scores. The study was aimed to assess DNA methylation signatures in various BC subtypes for clinical endpoints and patients' clinicopathological characteristics. The data on methylation of CpG dinucleotides (probes) and clinical characteristics of BC samples were obtained from The Cancer Genome Atlas Breast Cancer database. CpG dinucleotides associated with the selected endpoints were chosen by univariate Cox regression method. The LASSO method was used to search for stable probes, while further signature construction and testing of the clinical characteristics independence were performed using multivariate Cox regression. The diagnostic and prognostic potential of the signatures was assessed using ROC analysis and Kaplan–Meier curves. It has been shown that the signatures of selected probes have a significant diagnostic (AUC 0.76–1) and prognostic ( $p < 0.05$ ) potential. This approach has made it possible to identify 47 genes associated with good and poor prognosis, among these five genes have been described earlier. If the genome-wide DNA analysis results are available, the research approach applied can be used to study molecular pathogenesis of BC and other disorders.

**Keywords:** breast cancer, molecular subtypes, survival analysis, DNA methylation, prognostic markers

**Funding:** the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies in 2019–2027 (agreement № 075-15-2021-1073).

**Author contribution:** Kalinkin AI — study design, data acquisition, analysis and interpretation, manuscript writing; Sigin VO — manuscript writing; Nemtsova MV — study concept and design; Strelnikov VV — study concept and design, scientific editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey I. Kalinkin  
Moskvorechye, 1, Moscow, 115522; alexeika2@yandex.ru

**Received:** 18.10.2022 **Accepted:** 11.11.2022 **Published online:** 25.11.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.056

По данным организации мониторинга онкологических заболеваний GLOBOCAN, в 2020 г. зарегистрировано около 2,3 млн новых случаев и 684 996 смертей от рака

молочной железы (РМЖ), который занимает первое место по частоте среди онкологических заболеваний во всем мире [1] и представляет собой высокогетерогенное



заболевание с различными молекулярными и клиническими характеристиками [2].

В настоящее время в широкой клинической практике подтип РМЖ определяют в опухолевой ткани иммуногистохимическим (ИГХ) методом [3] в том числе по экспрессии в опухоли белков-рецепторов эстрогена, прогестерона, HER2, а также скорости деления опухолевых клеток. Разработка методов анализа экспрессии генов с помощью ДНК-микрочипов сыграла важную роль в определении молекулярных подтипов РМЖ. С помощью использования классификатора на основе экспрессии 50 генов PAM50 удается четко выделить люминальный A (LumA), люминальный B (LumB), HER2-обогащенный (HER2+) молекулярные подтипы и базальноподобный или тройной негативный РМЖ (ТН РМЖ) [4]. ТН РМЖ включает в себя 15–20% всех случаев РМЖ и характеризуется агрессивным течением, высоким уровнем метастазирования, частым возникновением рецидивов и низкой выживаемостью по сравнению с другими подтипами РМЖ [5]. Мультигенные микрочиповые диагностические системы позволяют получить важную прогностическую информацию для онкологических больных, особенно в случае двусмысленного прогноза по результатам клинических характеристик и иммуногистохимических маркеров. К таким системам относят MammaPrint/Blueprint и Prosigna/PAM50, которые в дополнении к их прогностической и предикторной ценности предоставляют возможность разбиения на молекулярные подтипы [6]. Данные системы можно использовать для определения оценки высокого и низкого рисков рецидива для пациенток с РМЖ, однако для ТН РМЖ и HER2+-молекулярного подтипа такая возможность пока отсутствует ввиду недостатка клинических исследований.

Эпигенетические изменения модулируют использование генома с помощью модификаций гистонов, вариантного состава гистонов, ремоделинга хроматина, метилирования ДНК, расположения нуклеосом и некодирующих РНК (экспрессия специфичных микроРНК). Для проявления своего эффекта вышеперечисленные эпигенетические изменения действуют совместно. Метилирование ДНК является одним из наиболее известных факторов регуляции экспрессии генов. Оно происходит за счет ковалентной модификации цитозина путем присоединения метильной группы в контексте CpG-динуклеотида к 5'-углероду пиримидинового кольца [7]. CpG-динуклеотиды обычно концентрируются в CG-богатых участках ДНК под названием CpG-островки, значительная часть которых сосредоточена в промоторных участках гена и в областях с длинными повторами, например в ретротранспозонных элементах или центромерных повторах. Реакцию метилирования цитозина опосредует класс ферментов под названием метилтрансферазы (DNMT) [7]. Всего у млекопитающих идентифицировано пять членов семейства DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b и DNMT3L. DNMT3a и DNMT3b являются метилтрансферазами *de novo*, которые взаимодействуют с неметилированными CpG-динуклеотидами. DNMT1 выполняет функцию поддержания метилирования при репликации в S-фазе. Было показано, что DNMT3L стимулирует метилирование *de novo*, которое происходит с помощью DNMT3a и опосредует репрессию транскрипции с помощью гистондеацетилазы 1 (HDAC1) [7]. Аберрантное метилирование ДНК связано с широким спектром заболеваний и наиболее выражено в злокачественных опухолях [8]. Исследования последних лет продемонстрировали, что каждая эпителиальная

опухоль содержит приблизительно 10–15 генов, инактивированных структурными изменениями генома, и несколько сотен, инактивированных гиперметилированием ДНК, что демонстрирует значение этой модификации в развитии опухоли. Другой особенностью опухолевых геномов является их тотальное гипометилирование. Это полногеномное гипометилирование, происходящее главным образом из-за потери метилирования повторяющихся элементов, ведет к геномной нестабильности и хромосомным перестройкам [8]. Важную роль в патогенезе РМЖ играет повышенное промоторное метилирование в генах-супрессорах опухолевого роста, которые подавляют различные механизмы опухолевого прогрессирования, приводящее к их эпигенетическому «умолчанию» и обратимой инактивации [8]. Идентификация опухолеспецифичных паттернов аберрантного метилирования ДНК может быть полезным для ранней диагностики рака, дифференциальной диагностики злокачественных новообразований, в качестве прогностических и предикторных маркеров [9]. Изучение специфичных паттернов метилирования ДНК, выявляемых с использованием широкогеномных методов анализа, вносит важный вклад в понимание молекулярного патогенеза рака молочной железы [10]. Как отмечалось выше, каждый тип рака подразделяется на подтипы, и существуют геномные паттерны, в том числе эпигенетические, характерные для этих подтипов. Таким образом, необходимо проведение специфического широкогеномного профилирования метилирования ДНК при онкологических заболеваниях, наряду с традиционными исследованиями точечных событий гиперметилирования промоторов отдельных генов [11].

Прогнозирование подразумевает под собой предсказание вероятного течения и исхода онкологического заболевания. Анализ выживаемости основан на математическом подходе к прогнозированию онкологического заболевания и позволяет предсказать вероятность жизни после определенного времени. Маркеры метилирования ДНК благодаря их биологической важности и стабильности являются эффективным прогностическим фактором [12]. В одной из работ на основе данных результатов широкогеномного анализа метилирования ДНК в образцах РМЖ в составе базы The Cancer Genome Atlas Breast Cancer (TCGA-BRCA) была построена модель из семи CpG-динуклеотидов, в которой хорошо различают опухоли молочной железы всех подтипов и нормальные ткани, а также идентифицировано шесть сайтов метилирования, которые высоко коррелировали с общей выживаемостью (ОВ) [13]. В ходе анализа данных метилирования из открытых источников с помощью LASSO-регрессии и бустинга были обнаружены соответственно 29 и 11 CpG-динуклеотидов, связанных с ОВ [14]. Исследование данных из открытого источника TCGA-BRCA тоже позволило выявить три гена (TDRD10, PRAC2 и TMEM132C), состояние метилирования которых имеет прогностическую ценность, но преимущественно для эстроген-положительных опухолей молочной железы [15]. Для ТН РМЖ была разработана прогностическая модель на основании данных из источника TCGA-BRCA, состоящая из пяти генов (*TGFBR2*, *EIF4EBP1*, *FOSB*, *BCL2A1*, *ADRB2*), которая одинаково хорошо прогнозирует ОВ и безрецидивную выживаемость (БРВ) [16].

Необходимость в проведении исследования обусловлена отсутствием таких сигнатур для HER2-обогащенного подтипа и довольно ограниченным количеством для остальных

**Таблица 1.** Клинико-патологические характеристики и данные о статусе клинических конечных точек для пациенток с LumAB, TH PMЖ и HER2-обогащенным молекулярными подтипами PMЖ из открытого источника TCGA-BRCA

Характеристики	LumAB	TH PMЖ	HER2-обогащенный
Число образцов (%)	555	134	46
Возраст (медиана), лет	59	54	58
T (%)			
T1	148 (26.49)	26 (19.4)	12 (26.09)
T2	310 (55.86)	87 (64.93)	28 (60.87)
T3	81 (14.59)	16 (11.94)	3 (6.52)
T4	14 (2.52)	4 (2.99)	3 (6.52)
Нет информации	2 (0.36)	1 (0.75)	–
N (%)			
N0	233 (41.98)	78 (58.21)	16 (34.78)
N1	197 (35.5)	41 (30.6)	17 (36.96)
N2	75 (13.51)	11 (8.21)	6 (13.04)
N3	42 (7.57)	4 (2.99)	4 (8.7)
Нет информации	8 (1.44)	–	3 (6.52)
M (%)			
M0	431 (77.66)	110 (82.09)	37 (80.43)
M1	6 (1.08)	3 (2.24)	1 (2.17)
Нет информации	118 (21.26)	21 (15.67)	8 (17.39)
Стадия (%)			
I	98 (17.66)	16 (11.94)	4 (8.7)
II	291 (52.43)	94 (70.15)	28 (60.87)
III	154 (27.75)	19 (14.18)	12 (26.09)
IV	5 (0.9)	2 (1.49)	1 (2.17)
Нет информации	7 (1.26)	3 (2.24)	1 (2.17)
Тип выживаемости			
Общая выживаемость (%)			
Без события	490 (88.29)	113 (84.33)	37 (80.43)
Смерть	65 (11.71)	21 (15.67)	9 (19.57)
Безрецидивная выживаемость (%)			
Без рецидива	445 (80.18)	102 (76.12)	35 (76.09)
Наступление рецидива	39 (7.03)	20 (14.93)	4 (8.7)
Нет информации	71 (12.79)	12 (8.96)	7 (15.22)
Выживаемость без признаков прогрессирования заболевания (%)			
Без прогрессирования	486 (87.57)	109 (81.34)	38 (82.61)
Наступление прогрессирования	69 (12.43)	25 (18.66)	8 (17.39)

молекулярных подтипов PMЖ. Диагностический потенциал существующих моделей для прогнозирования выживаемости тоже остается неясным, поэтому мы использовали модифицированный алгоритм для поиска CpG-динуклеотидов, ассоциированных со всеми доступными клиническими конечными точками из базы данных TCGA-BRCA.

Целью данного исследования было получить различные сигнатуры на основании открытых данных ДНК-метилирования в PMЖ The Cancer Genome Atlas Breast Cancer для прогнозирования различных типов выживаемости пациенток (общей выживаемости, безрецидивной выживаемости и выживаемости без прогрессирования) в молекулярных подтипах PMЖ и проверить зависимость клинико-патологических характеристик от полученных сигнатур.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Публично доступные клинические параметры, а также данные широкогеномного профилирования метилирования ДНК, полученные с помощью гибридационных чипов HumanMethylation450 (HM450) (Illumina Inc.; CLIA) проекта The Cancer Genome Atlas Breast Cancer (TCGA-BRCA) (<https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-BRCA>), получали и обрабатывали с помощью пакета программ TCGAbiolinks [17]. Критерии включения пациентов для дальнейшего отбора кандидатных CpG-пар были следующими: наличие соответствующего молекулярного подтипа PMЖ, наличие доступной клинико-патологической информации, наличие данных о профилировании метилирования ДНК с чипов Illumina HumanMethylation450. Критерии исключения: отсутствие данных о показателях времени для клинических



**Таблица 2.** Суммарное количество сигнатур и CpG-пары, полученные в результате LASSO регрессии Кокса для каждого типа выживаемости и молекулярного подтипа РМЖ. Для некоторых CpG-пар не удалось установить принадлежность к гену

Тип выживаемости + молекулярный подтип	Идентификаторы зондов HM450	Гены	Число полученных комбинаций
ОВ + LumAB	cg02287630; cg20417424 cg05828605 cg00297993 cg20471297 cg08133669 cg17323488 cg08241401 cg00815177 cg08442529 cg20746134 cg01821113 cg04523731 cg11140305 cg22067527	<i>SLC30A7; EXTL2; ST6GALNAC5; C15orf41; DYNC1H1; MIA3; NIPAL3; HEY2; HK1; DIRC3; TMEM41A; SH3BP5L; RFX2</i>	32752
БПВ + LumAB	cg22790777 cg23667405 cg01017355 cg09561458 cg08128789 cg27304144 cg08039281 cg13486627 cg04833210 cg27439396 cg24347894	<i>SLC25A39; BAT2; ZNF417; LRRC8B; HSPG2; PSMA6; RG9MTD3; RBM19; N6AMT2; ZNF827</i>	2036
ВБП + LumAB	cg13792075 cg08128789 cg13447284 cg00815177 cg10466124 cg13486627 cg15481636 cg00120948 cg05564086 cg23667405 cg17960080	<i>LRRC8B; HIST3H2A; ABCC5; BAT2; SPAG5; RERE; NIPAL3; HLA-DRB5; RG9MTD3</i>	2036
ОВ + TH РМЖ	cg03512997 cg07804617 cg12814969 cg14293027 cg15355719 cg17053075 cg19002462 cg26401512 cg02567719	<i>FAM136A; HNRPD; ENOPH1; LIN54; DNAB4; ZNF643; TAP1; RASGRP2; LDLRAD3</i>	502
БПВ + TH РМЖ	cg20154816 cg02927111 cg18701707 cg12484411 cg20222926 cg02338142 cg06667406 cg13420273 cg22512222 cg17804981 cg13745678	<i>FEZF1; PLIN5; KCNMB2; AASS; HDAC9; ZFAND1; TRHR; PKNOX1</i>	2036
ВБП + TH РМЖ	cg01652244 cg02927111 cg20154816 cg00355315 cg24083274 cg23390595 cg13420273 cg10170774 cg01323371	<i>SSU72; DPPA5; PEX5L; HDAC9; CADPS2; STC1; PKNOX1</i>	502
ОВ + HER2-обогащенный	cg19236995 cg01564068 cg07351262 cg23409370 cg26290926 cg22043168 cg19986472 cg01647795	<i>GSTM4; BDNF; SLC43A1; PATL2; DHX8</i>	247
БПВ + HER2-обогащенный	cg02327465 cg11261264 cg23302638 cg27252154 cg10660854 cg02796790 cg04407660 cg23183932	<i>BIRC5; EDARADD; TAPBPL; QTRT1; PTPRH; SNRPB</i>	247

конечных точек, возрасте пациента, классификации TNM и стадии. В дальнейшем из матрицы данных профилирования были исключены результаты, полученные с FFPE (formalin fixed paraffin-embedded) блоков пациенток, а также кросс-гибридизационные зонды.

Отбор CpG-пар, ассоциированных с ОВ, БПВ или выживаемостью без признаков прогрессирования заболевания (ВБП), производили с помощью одномерной регрессии Кокса (Univariate Cox regression) [18]. Из отобранных CpG-пар в дальнейший анализ были включены прошедшие поправку на множественное тестирование (скорректированный показатель  $p < 0,05$ , использовали тест Уальда) методом средней доли ложных отклонений гипотез (False Discovery Rate, FDR). В целях отбора наиболее стабильных CpG-пар использовали метод LASSO-регрессии Кокса (Cox LASSO-regression) [19]

пакета программ SurvHiDim [20]. Многомерную регрессию Кокса [21] применяли для расчета сигнатур из CpG-пар и проверки независимости клинических параметров пациенток на эти сигнатуры. С помощью логистической регрессии определяли способность к классификации различных исходов. Для стратификации на высокий и низкий уровень риска использовали медиану. Методом cvROC (cross-validated receiver operative curve) [22] определяли качество построенных моделей и строили ROC-кривые. Наилучшие показатели чувствительности и специфичности определяли с помощью индекса Юдена. Кривые Каплана–Майера были построены с помощью пакета survminer [23]. Для сравнения двух кривых выживаемости использовали критерий Мантеля–Кокса. Для всех этапов выбора маркеров и вычисления сигнатур использовали 10-кратную рандомизированную кросс-валидацию. Все

**Таблица 3.** Лучшая сигнатура, количество зондов в сигнатуре и показатели cvAUC (cross-validated area under curve; средняя площадь под кривой, полученная на всех этапах кросс-валидации), чувствительности, специфичности и точности для каждого типа выживаемости и молекулярного подтипа РМЖ

Тип выживаемости + молекулярный подтип	Число зондов в комбинации	Гены в комбинации	cvAUC	Чувствительность	Специфичность	Точность
ОВ + LumAB	12	<i>SLC30A7, EMTL2, C15orf41, MIA3, NIPAL3, HEY2, HK1, DIRC3, TMEM41A, SH3BP5L, RFX2</i>	0,797	0,829	0,629	0,805
БРВ + LumAB	6	<i>SLC25A39, BAT2, ZNF417, PSMA6, RG9MTD3, ZNF827</i>	0,831	0,838	0,716	0,828
ВБП + LumAB	9	<i>ABCC5, NIPAL3, HLA-DRB5, RG9MTD3, HIST3H2A, RERE, SPAG5, BAT2, cg13447284</i>	0,761	0,875	0,562	0,836
ОВ + ТН РМЖ	5	<i>cg03512997, LIN54, RASGRP2, LDLRAD3, ZNF643</i>	0,969	0,864	0,939	0,876
БРВ + ТН РМЖ	5	<i>PKNOX1, KCNMB2, ZFAND1, HDAC9, cg13745678</i>	0,834	0,902	0,673	0,865
ВБП + ТН РМЖ	6	<i>DPPA5, cg02927111, PKNOX1, SSU72, CADPS2, PEX5L</i>	0,844	0,952	0,674	0,900
ОВ + HER2-обогащенный	3	<i>GSTM4 (TSS200), GSTM4 (Body), cg26290926</i>	0,898	1	0,883	0,977
БРВ + HER2-обогащенный	2	<i>BIRC5, cg10660854</i>	1	1	1	1
ВБП + HER2-обогащенный	4	<i>SLC43A1, BOD1, cg00297843, KCNN1</i>	1	0,947	1	0,956

вышеуказанные вычисления выполняли с помощью языка статистического программирования R [24].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемый массив данных TCGA-BRCA состоял из профиля ДНК-метилирования, полученного с помощью чипов HM450 и клинико-патологических характеристик 735 образцов первичных опухолей РМЖ. После исключения образцов из парафиновых блоков суммарно осталось 555 образцов LumA+B подтипа (LumAB), 134 образца ТН-подтипа и 46 образцов HER2-обогащенного подтипа (табл. 1). Перед отбором признаков для дальнейшего анализа из матрицы метилирования исключили кросс-гибридизационные зонды, вследствие чего число зондов снизилось с 485 577 до 456 344 соответственно.

Дальнейшим этапом анализа было применение одномерной регрессии Кокса для поиска сайтов метилирования, которые коррелировали с продолжительностью ОВ, БРВ и ВБП в разных молекулярных подтипах РМЖ. Всего, после первоначального отбора, с учетом *p*-value с поправкой на множественное тестирование, были выделены:

- в подтипах LumAB — 10 433 зондов, ТН — 3214 зондов, HER2-обогащенном — 6471 зонд, ассоциированный с ОВ;
- в подтипах LumAB — 4419 зондов, ТН — 168 зондов, HER2-обогащенном — 483 зонда, ассоциированных с БРВ;
- в подтипах LumAB — 2345 зондов, ТН — 43 зонда, HER2-обогащенном — 3216 зондов, ассоциированных с ВБП.

Для каждого из этих наборов была применена LASSO-регрессия Кокса, что позволило отобрать наиболее важные для анализа CpG-динуклеотиды. На каждом этапе кросс-валидации выявляли разное число таких CpG-пар, и были отобраны такие CpG-пары, которые встречались больше чем в 50% кросс-валидационных разбиений (табл. 2).

Для выбора сочетаний CpG-динуклеотидов, обеспечивающих значимую связь для различных типов выживаемости, были оценены все возможные комбинации (сигнатуры) таких CpG-динуклеотидов в различных

молекулярных подтипах РМЖ. Для каждой клинической конечной точки и молекулярного подтипа РМЖ были получены результаты cvAUC (cross-validated area under curve, усредненная площадь под кривой на каждом этапе кросс-валидации), чувствительности, специфичности и точности для различных комбинаций. Первые 10 комбинаций с высокими показателями cvAUC были проверены на независимость от клинико-патологических характеристик, и диагностические характеристики этих комбинаций вместе с числом зондов и указанием принадлежности генов к зондам представлены в табл. 3.

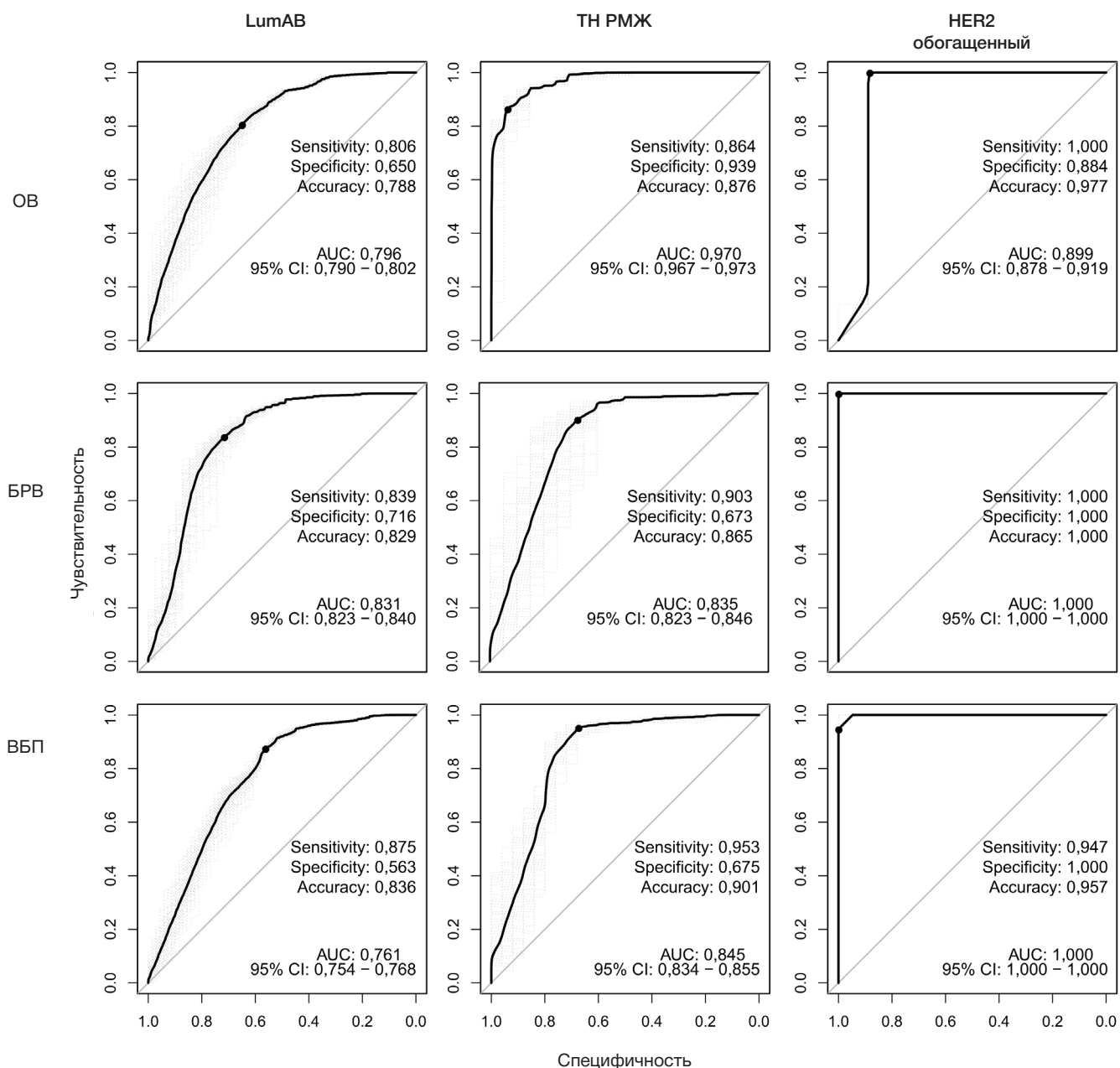
Наибольшей установленной нами комбинацией является комбинация из двенадцати CpG-динуклеотидов для прогнозирования ОВ в LumAB подтипе, а меньшей — сочетание из двух CpG-динуклеотидов для прогнозирования БРВ в HER2-экспрессирующем подтипе. Для каждой сигнатуры были построены кривые cvROC (cross-validated receiver operative characteristics, на каждом этапе кросс-валидации строится ROC-кривая, в дальнейшем строится усредненная кривая) и кривые Каплана–Майера для отображения диагностического потенциала и оценки функции выживаемости. Комбинации для LumAB имели меньший показатель cvAUC (от 0,76 до 0,83), тогда как комбинации для ТН и HER2-экспрессирующего подтипа показывали высокий уровень cvAUC при меньших количествах сочетаний (от 0,83 до 1) (рис. 1).

Наши комбинации являются независимыми от клинических характеристик (табл. 4), что позволяет использовать показатели риска данных типов выживаемости для любых групп пациенток.

Анализ кривых Каплана–Майера показал статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение ОВ, БРВ и ВБП в группе пациенток с высоким риском летального исхода, рецидива и прогрессирования болезни по сравнению с группой пациенток с низким риском при всех молекулярных подтипах РМЖ для каждой из выбранных комбинаций (рис. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании с помощью методов анализа выживаемости, а также с использованием



**Рис. 1.** Кривые cvROC (cross-validated receiver operative curve; на каждом этапе кросс-валидации строится ROC-кривая и в результате — результирующая средняя ROC-кривая) для лучших сигнатур. По оси абсцисс показана чувствительность (от 0 до 1), по оси ординат — специфичность (от 0 до 1), по строкам — типы выживаемости, по столбцам — молекулярные подтипы РМЖ

данных ДНК-метилирования была рассмотрена возможность идентификации сайтов дифференциального метилирования CpG-динуклеотидов для прогнозирования видов выживаемости в различных молекулярных подтипах РМЖ. Подход для расчета дифференциального метилирования с помощью одномерной регрессии Кокса широко используют в различных работах. Так, этот метод применяли для идентификации 249 810 и 249 811 зондов в данных ДНК-метилирования при раке яичников и при РМЖ соответственно [12] и для идентификации зондов в данных ДНК-метилирования при меланоме кожи [25].

Нами показано, что при использовании различных комбинаций (от 2 до 12 CpG-динуклеотидов) можно добиться приемлемого (cvAUC между 0,7 и 0,8), хорошего (от 0,8 до 0,9) и очень хорошего (от 0,9 до 1) качества классификации высокого и низкого риска летального исхода, рецидива и прогрессирования. В рамках данной работы были идентифицированы 47 зондов/генов

(*SLC30A7*, *EXTL2*, *C15orf41*, *MIA3*, *NIPAL3*, *HEY2*, *HK1*, *DIRC3*, *TMEM41A*, *SH3BP5L*, *RFX2*, *SLC25A39*, *BAT2*, *ZNF417*, *PSMA6*, *RG9MTD3*, *ZNF827*, *ABCC5*, *HLA-DRB5*, *HIST3H2A*, *RERE*, *SPAG5*, *cg13447284*, *cg03512997*, *LIN54*, *RASGRP2*, *LDLRAD3*, *ZNF643*, *PKNOX1*, *KCNMB2*, *ZFAND1*, *HDAC9*, *cg13745678*, *DPPA5*, *cg02927111*, *PKNOX1*, *SSU72*, *CADPS2*, *PEX5L*, *GSTM4*, *cg26290926*, *BIRC5*, *cg10660854*, *SLC43A1*, *BOD1*, *cg00297843*, *KCNN1*), метилирование которых ассоциировано с ОБ, БПВ и БП, при этом для семи из них (*cg13447284*, *cg03512997*, *cg13745678*, *cg02927111*, *cg26290926*, *cg10660854*, *cg00297843*) не удалось установить принадлежность к генам, а пять из них (*BIRC5*, *PKNOX1*, *SPAG5*, *HDAC9*, *PSMA6*) ранее были описаны в научной литературе как молекулярные маркеры выживаемости больных с РМЖ на основе данных об количественной экспрессии генов [26–31].

Примечательно, что в рамках данного исследования мы обнаружили такое же число CpG-динуклеотидов

**Таблица 4.** Результаты многофакторной регрессии Кокса для лучших сигнатур и клинико-патологических характеристик. HR — hazard ratio (показатель относительного риска), P — отвечает за p-val

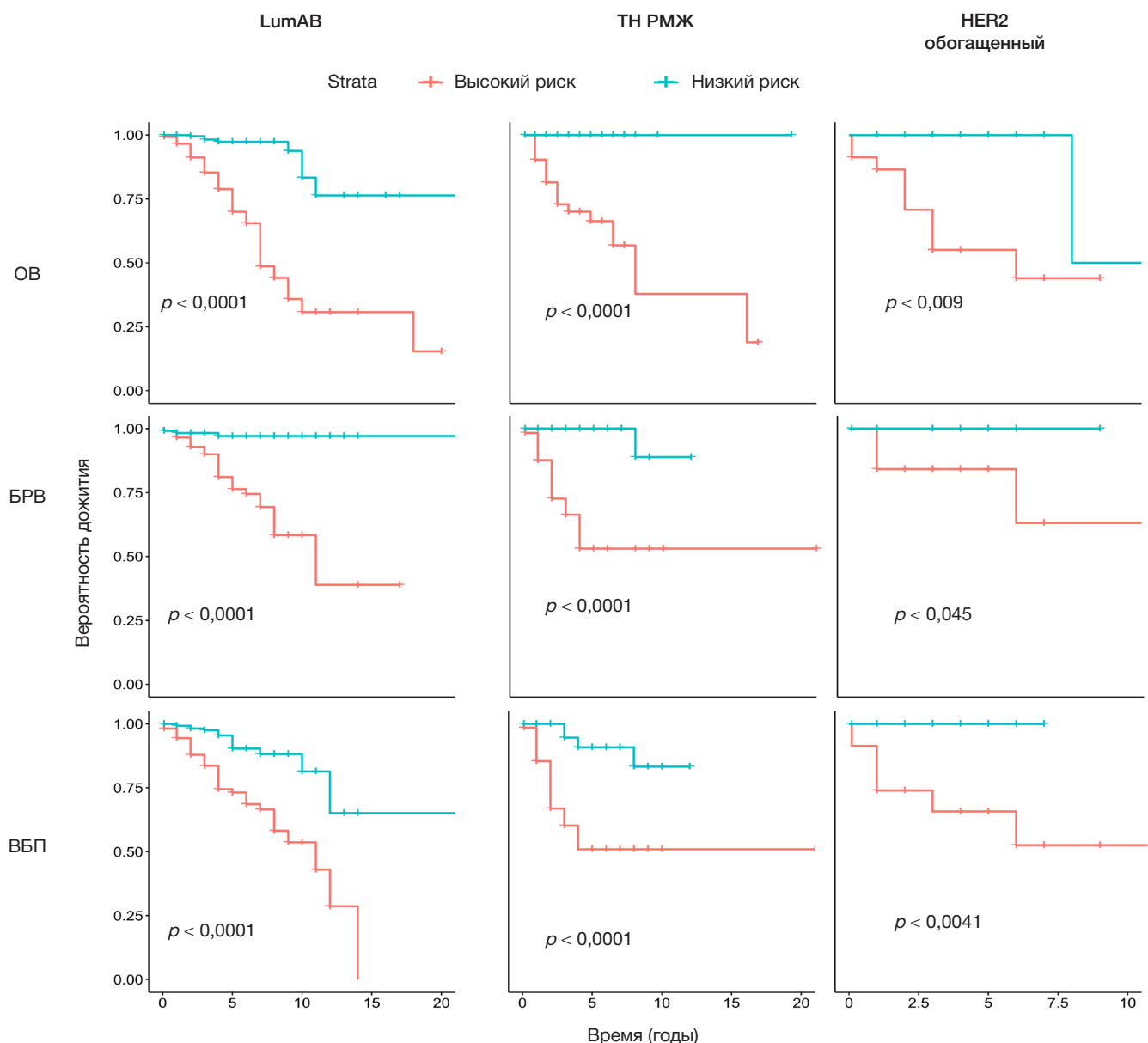
Переменная / тип выживаемости + молекулярный подтип	ОВ + LumAВ		БРВ + LumAВ		ВБП + LumAВ		ОВ + TH РМЖ		БРВ + TH РМЖ		ВБП + TH РМЖ		ОВ + HER2-обогащенный		БРВ + HER2-обогащенный		ВБП + HER2-обогащенный	
	HR (95% дов. интервал)	P	HR (95% дов. интервал)	P	HR (95% дов. интервал)	P	HR (95% дов. интервал)	P	HR (95% дов. интервал)	P	HR (95% дов. интервал)	P	HR (95% дов. интервал)	P	HR (95% дов. интервал)	P	HR (95% дов. интервал)	P
Показатель Риска	1 (1–1)	< 0.001	1.1 (1.05–1.10)	< 0.001	1.03 (1.02–1.04)	< 0.001	1.1 (1.004–1.2)	< 0.001	1.02 (1.01–1.03)	< 0.001	1.02 (1.001–1.03)	< 0.001	1.0 (1–1)	0.03	1.02 (1.009–1.03)	0.006	1.005 (1.001–1.000)	0.01
Возраст (Меньше медианы/больше медианы)	1,38 (0,84–2,30)	0,201	1,2 (0,58–2,40)	0,638	2 (0,9–3,30)	0,231	0,76 (0,28–2,00)	0,575	0,51 (0,160–1,600)	0,25	0,66 (0,270–1,600)	0,35	6,2 (0,619–62,900)	0,12	1,9 (0,878–2,344)	0,512	2,06 (0,27–15)	0,47
T (T1–2/3–4)	0,87 (0,48–1,60)	0,64	1,1 (0,48–2,60)	0,78	0,77 (0,38–1,60)	0,463	2,52 (0,75–8,40)	0,134	1,06 (0,310–3,600)	0,93	1,50 (0,430–5,200)	0,52	2,6 (0,169–39,900)	0,49	0,9 (0,625–1,932)	0,404	7,00 (0,50–98)	0,14
N (N0/N1–3)	1,23 (0,74–2,00)	0,42	2,1 (0,73–6,00)	0,16	1,1 (0,56–2,20)	0,097	2,95 (0,88–9,90)	0,08	0,96 (0,280–3,300)	0,95	1,14 (0,390–3,300)	0,81	1,1 (0,174–7,500)	0,89	0,34 (0,120–1,500)	0,463	1,09 (0,07–16)	0,94
M (M0/M1)	1,03 (0,51–2,10)	0,94	1,6 (0,66–3,80)	0,30	1,9 (0,90–2,20)	0,076	0,36 (0,09–1,30)	0,125	1,56 (0,360–6,700)	0,55	0,89 (0,290–2,800)	0,83	1,2 (0,089–15,300)	0,90	0,63 (0,105–2,000)	0,376	0,02 (0,00–1,05)	0,053
Стадия (I–II/III–IV)	1,20 (0,71–2,00)	0,49	2,3 (0,95–5,50)	0,06	1,54 (0,80–2,90)	0,19	1,48 (0,36–6,00)	0,58	4,19 (0,94–18,60)	0,06	3,76 (0,97–14,50)	0,055	1,10 (0,09–14,30)	0,91	2,6 (0,078–2,80)	0,16	1,83 (0,12–27,00)	0,66

(зондов HM450) для прогнозирования ОВ и БРВ (по пяти зондам), что и в другой работе [16], но зонды различались по принадлежности к генам. Согласно нашим данным, сигнатура для прогнозирования ВБП состоит из шести зондов; в работе [16] сигнатуру ВБП не вычисляли. Другие исследователи предлагают использовать для прогноза ОВ и БРВ больных с ЭР + РМЖ индивидуальные маркеры промоторного гиперметилирования семи генов (*RASSF1*, *BRCA1*, *PITX2*, *RARB*, *PGR*, *CDH1* и *PCDH10*), а также рассматривают использование панели из трех генов (*GSTP1*, *RASSF1* и *RARB*) для предсказания ОВ, основываясь на анализе литературных данных (по результатам систематического обзора публикаций) [26], в то время как в нашем исследовании применена стратегия формирования панелей из шести, девяти и 12 маркеров метилирования с учетом диагностического потенциала маркеров, установленного статистическим анализом массива экспериментальных данных.

Среди генов, вошедших в полученные нами комбинации, внимание привлекает ген *BIRC5* (кодирует белок — бакуловирусный ингибитор мотива апоптозных повторов 5), который гиперэкспрессируется в большинстве опухолей, в том числе при РМЖ, связан с худшим

прогнозом общей, безрецидивной и метастатической выживаемости. Показано, что использование химиотерапевтических препаратов из группы таксанов может увеличивать экспрессию данного гена [27]. Ген *PKNOX1* (кодирует одноименный белок, расположен на коротком плече 21-й хромосомы, играет важную роль в эмбриональном развитии) является онкосупрессором, а его повышенная экспрессия ассоциирована с худшей выживаемостью [28]. Прогностическим фактором является также повышенная экспрессия гена *SPAG5* (кодирует белок, связанный с аппаратом митотического веретена), ассоциированная с худшим прогнозом ОВ, БРВ и выживаемости без метастазирования только для эстроген-положительных (ЭР+) опухолей молочной железы [29], что также подтверждается нашим исследованием. Результаты исследования, проведенного на образцах ЭР+ РМЖ, показывают, что повышенная экспрессия гена эпигенетического фермента *HDAC9* (кодирует белок фермента гистондеацетилазы 9) в опухолях связана с худшим прогнозом БРВ [30]. В нашей работе показана ассоциация аномального метилирования этого гена с выживаемостью для больных с эстроген-отрицательными (ЭР-) опухолями, точнее с TH РМЖ. Сниженная БРВ





**Рис. 2.** Кривые Каплан-Мейера для лучших сигнатур. По оси ординат показано время в годах, по оси абсцисс — вероятность жизни (от 0 до 1). Красным цветом указан высокий риск летального исхода, прогрессирования или рецидива, бирюзовым — низкий риск летального исхода, прогрессирования или рецидива. По строкам обозначены типы выживаемости, по столбцам — молекулярные подтипы РМЖ

больных с ЭР+ РМЖ была показана при повышенной экспрессии гена PSMA6 (кодирует белок протеасомной субъединицы альфа-типа-6) [31], что также подтверждают результаты нашего исследования.

## ВЫВОДЫ

С помощью методов анализа выживаемости, сочетания различных сайтов метилирования и оценки диагностических показателей были обнаружены молекулярные эпигенетические

сигнатуры для различных подтипов РМЖ. Данную методику можно рекомендовать для поиска сигнатур, характерных для РМЖ, а также для других опухолевых заболеваний. В дальнейшем обнаруженные нами эпигенетические сигнатуры можно использовать для разработки диагностических тест-систем на основе метилчувствительной количественной ПЦР. Такие тест-системы при прохождении клинических испытаний могут стать более дешевой и практичной альтернативой экспрессионным микрочипам без ущерба для диагностической эффективности.

## Литература

1. 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. DOI: 10.3322/caac.21660
2. Bernhardt SM, Dasari P, Walsh D, Townsend AR, Price TJ, Ingman WW. Hormonal Modulation of Breast Cancer Gene Expression: Implications for Intrinsic Subtyping in Premenopausal Women. *Front Oncol.* 2016; 6: 241. DOI: 10.3389/fonc.2016.00241.
3. Zaha DC. Significance of immunohistochemistry in breast cancer.

- World J Clin Oncol. 2014; 5 (3): 382–92. DOI: 10.5306/wjco.v5.i3.382. PMID: 25114853; PMCID: PMC4127609.
4. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406 (6797): 747–52. DOI: 10.1038/35021093.
  5. Echeverria GV, Ge Z, Seth S, Zhang X, Jeter-Jones S, Zhou X, et al. Resistance to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer mediated by a reversible drug-tolerant state. *Sci Transl Med*. 2019; 11 (488): eaav0936. DOI: 10.1126/scitranslmed.aav0936.
  6. Blanchette P, Sivajohanathan D, Bartlett J, Eisen A, Feilott H, Pezo R, et al. Clinical Utility of Multigene Profiling Assays in Early-Stage Invasive Breast Cancer: An Ontario Health (Cancer Care Ontario) Clinical Practice Guideline. *Curr Oncol*. 2022; 29 (4): 2599–615. DOI: 10.3390/curroncol29040213.
  7. Edwards JR, Yarychivska O, Boulard M, Bestor TH. DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin*. 2017; 10: 23. DOI: 10.1186/s13072-017-0130-8.
  8. Vietri MT, D'Elia G, Benincasa G, Ferraro G, Caliendo G, Nicoletti GF, et al. DNA methylation and breast cancer: A way forward (Review). *Int J Oncol*. 2021; 59 (5): 98. DOI: 10.3892/ijo.2021.5278.
  9. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*. 2007; 8 (4): 286–98. DOI: 10.1038/nrg2005.
  10. Karami Fath M, Azarjoojahromi A, Kiani A, Jalalifar F, Osati P, Akbari Oryani M, et al. The role of epigenetic modifications in drug resistance and treatment of breast cancer. *Cell Mol Biol Lett*. 2022; 27 (1): 52. DOI: 10.1186/s11658-022-00344-6.
  11. Lee G, Bang L, Kim SY, Kim D, Sohn KA. Identifying subtype-specific associations between gene expression and DNA methylation profiles in breast cancer. *BMC Med Genomics*. 2017; 10 (Suppl 1): 28. DOI: 10.1186/s12920-017-0268-z.
  12. Hu WL, Zhou XH. Identification of prognostic signature in cancer based on DNA methylation interaction network. *BMC Med Genomics*. 2017; 10 (Suppl 4): 63. DOI: 10.1186/s12920-017-0307-9.
  13. Zhang M, Wang Y, Wang Y, Jiang L, Li X, Gao H, et al. Integrative Analysis of DNA Methylation and Gene Expression to Determine Specific Diagnostic Biomarkers and Prognostic Biomarkers of Breast Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 529386. DOI: 10.3389/fcell.2020.529386.
  14. Hao X, Luo H, Krawczyk M, Wei W, Wang W, Wang J, et al. DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of common cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114 (28): 7414–9. DOI: 10.1073/pnas.1703577114.
  15. de Almeida BP, Apolônio JD, Binnie A, Castelo-Branco P. Roadmap of DNA methylation in breast cancer identifies novel prognostic biomarkers. *BMC Cancer*. 2019; 19 (1): 219. DOI: 10.1186/s12885-019-5403-0.
  16. Gao Y, Wang X, Li S, Zhang Z, Li X, Lin F. Identification of a DNA Methylation-Based Prognostic Signature for Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Med Sci Monit*. 2021; 27: e930025. DOI: 10.12659/MSM.930025.
  17. Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Carolini D, et al. TCGAAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44 (8): e71. DOI: 10.1093/nar/gkv1507.
  18. Abd ElHafeez S, D'Arrigo G, Leonardis D, Fusaro M, Tripepi G, Roumeliotis S. Methods to Analyze Time-to-Event Data: The Cox Regression Analysis. *Oxid Med Cell Longev*. 2021; 2021: 1302811. DOI: 10.1155/2021/1302811.
  19. Utazirubanda JC, Leon T, Ngom P. Variable selection with Group LASSO approach: Application to Cox regression with frailty model. *Commun Stat Simul Comput*. 2021; 50 (3): 881–901. DOI: 10.1080/03610918.2019.1571605.
  20. Bhattacharjee A, Pawar A. SurvHiDim: high dimensional survival data analysis. R package version 0.1.1. 2021. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=SurvHiDim>.
  21. Bradburn MJ, Clark TG, Love SB, Altman DG. Survival analysis part II: multivariate data analysis — an introduction to concepts and methods. *Br J Cancer*. 2003; 89 (3): 431–6. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601119.
  22. LeDell E, Petersen M, van der Laan M. cvAUC: Cross-Validated Area Under the ROC Curve Confidence Intervals. R package version 1.1-4. 2022 Available from: <http://CRAN.R-project.org/package=cvAUC>.
  23. Kassambara A, Kosinski M, Biecek P. survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version 0.4.6. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>.
  24. Team RCR Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria: 2015.
  25. Guo W, Zhu L, Zhu R, Chen Q, Wang Q, Chen JQ. A four-DNA methylation biomarker is a superior predictor of survival of patients with cutaneous melanoma. *Elife*. 2019; 8: e44310. DOI: 10.7554/eLife.44310.
  26. de Ruijter TC, van der Heide F, Smits KM, Aarts MJ, van Engeland M, Heijnen VCG. Prognostic DNA methylation markers for hormone receptor breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res*. 2020; 22 (1): 13. DOI: 10.1186/s13058-020-1250-9.
  27. Dai JB, Zhu B, Lin WJ, Gao HY, Dai H, Zheng L, et al. Identification of prognostic significance of BIRC5 in breast cancer using integrative bioinformatics analysis. *Biosci Rep*. 2020; 40 (2): BSR20193678. DOI: 10.1042/BSR20193678.
  28. Jiang S, Bu X, Tang D, Yan C, Huang Y, Fang K. A tumor suppressor gene-based prognostic classifier predicts prognosis, tumor immune infiltration, and small molecule compounds in breast cancer. *Front Genet*. 2022; 12: 783026. DOI: 10.3389/fgene.2021.783026.
  29. Mohamadizadeh-Hanjani Z, Shahbazi S, Geranpayeh L. Investigation of the SPAG5 gene expression and amplification related to the NuMA mRNA levels in breast ductal carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2020; 18 (1): 225. DOI: 10.1186/s12957-020-02001-8.
  30. Linares A, Assou S, Lapierre M, Thouennon E, Duraffourd C, Fromaget C, et al. Increased expression of the HDAC9 gene is associated with antiestrogen resistance of breast cancers. *Mol Oncol*. 2019; 13 (7): 1534–47. DOI: 10.1002/1878-0261.
  31. Li Y, Huang J, Sun J, Xiang S, Yang D, Ying X, et al. The transcription levels and prognostic values of seven proteasome alpha subunits in human cancers. *Oncotarget*. 2017 Jan 17; 8 (3): 4501–19. DOI: 10.18632/oncotarget.13885.

## References

1. 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. DOI: 10.3322/caac.21660
2. Bernhardt SM, Dasari P, Walsh D, Townsend AR, Price TJ, Ingman WW. Hormonal Modulation of Breast Cancer Gene Expression: Implications for Intrinsic Subtyping in Premenopausal Women. *Front Oncol*. 2016; 6: 241. DOI: 10.3389/fonc.2016.00241.
3. Zaha DC. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014; 5 (3): 382–92. DOI: 10.5306/wjco.v5.i3.382. PMID: 25114853; PMCID: PMC4127609.
4. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406 (6797): 747–52. DOI: 10.1038/35021093.
5. Echeverria GV, Ge Z, Seth S, Zhang X, Jeter-Jones S, Zhou X, et al. Resistance to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer mediated by a reversible drug-tolerant state. *Sci Transl Med*. 2019; 11 (488): eaav0936. DOI: 10.1126/scitranslmed.aav0936.
6. Blanchette P, Sivajohanathan D, Bartlett J, Eisen A, Feilott H, Pezo R, et al. Clinical Utility of Multigene Profiling Assays in Early-Stage Invasive Breast Cancer: An Ontario Health (Cancer Care Ontario) Clinical Practice Guideline. *Curr Oncol*. 2022; 29 (4):

- 2599–615. DOI: 10.3390/currancol29040213.
7. Edwards JR, Yarychivska O, Boulard M, Bestor TH. DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin*. 2017; 10: 23. DOI: 10.1186/s13072-017-0130-8.
  8. Vietri MT, D'Elia G, Benincasa G, Ferraro G, Caliendo G, Nicoletti GF, et al. DNA methylation and breast cancer: A way forward (Review). *Int J Oncol*. 2021; 59 (5): 98. DOI: 10.3892/ijo.2021.5278.
  9. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*. 2007; 8 (4): 286–98. DOI: 10.1038/nrg2005.
  10. Karami Fath M, Azargoonjahromi A, Kiani A, Jalalifar F, Osati P, Akbari Oryani M, et al. The role of epigenetic modifications in drug resistance and treatment of breast cancer. *Cell Mol Biol Lett*. 2022; 27 (1): 52. DOI: 10.1186/s11658-022-00344-6.
  11. Lee G, Bang L, Kim SY, Kim D, Sohn KA. Identifying subtype-specific associations between gene expression and DNA methylation profiles in breast cancer. *BMC Med Genomics*. 2017; 10 (Suppl 1): 28. DOI: 10.1186/s12920-017-0268-z.
  12. Hu WL, Zhou XH. Identification of prognostic signature in cancer based on DNA methylation interaction network. *BMC Med Genomics*. 2017; 10 (Suppl 4): 63. DOI: 10.1186/s12920-017-0307-9.
  13. Zhang M, Wang Y, Wang Y, Jiang L, Li X, Gao H, et al. Integrative Analysis of DNA Methylation and Gene Expression to Determine Specific Diagnostic Biomarkers and Prognostic Biomarkers of Breast Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 529386. DOI: 10.3389/fcell.2020.529386.
  14. Hao X, Luo H, Krawczyk M, Wei W, Wang W, Wang J, et al. DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of common cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114 (28): 7414–9. DOI: 10.1073/pnas.1703577114.
  15. de Almeida BP, Apolônio JD, Binnie A, Castelo-Branco P. Roadmap of DNA methylation in breast cancer identifies novel prognostic biomarkers. *BMC Cancer*. 2019; 19 (1): 219. DOI: 10.1186/s12885-019-5403-0.
  16. Gao Y, Wang X, Li S, Zhang Z, Li X, Lin F. Identification of a DNA Methylation-Based Prognostic Signature for Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Med Sci Monit*. 2021; 27: e930025. DOI: 10.12659/MSM.930025.
  17. Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, et al. TCGAAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44 (8): e71. DOI: 10.1093/nar/gkv1507.
  18. Abd ElHafeez S, D'Arrigo G, Leonardis D, Fusaro M, Tripepi G, Roumeliotis S. Methods to Analyze Time-to-Event Data: The Cox Regression Analysis. *Oxid Med Cell Longev*. 2021; 2021: 1302811. DOI: 10.1155/2021/1302811.
  19. Utazirubanda JC, Leon T, Ngom P. Variable selection with Group LASSO approach: Application to Cox regression with frailty model. *Commun Stat Simul Comput*. 2021; 50 (3): 881–901. DOI: 10.1080/03610918.2019.1571605.
  20. Bhattacharjee A, Pawar A. *SurvHiDim*: high dimensional survival data analysis. R package version 0.1.1. 2021. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=SurvHiDim>.
  21. Bradburn MJ, Clark TG, Love SB, Altman DG. Survival analysis part II: multivariate data analysis — an introduction to concepts and methods. *Br J Cancer*. 2003; 89 (3): 431–6. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601119.
  22. LeDell E, Petersen M, van der Laan M. *cvAUC*: Cross-Validated Area Under the ROC Curve Confidence Intervals. R package version 1.1-4. 2022 Available from: <http://CRAN.R-project.org/package=cvAUC>.
  23. Kassambara A, Kosinski M, Biecek P. *survminer*: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version 0.4.6. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>.
  24. Team RCR Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria: 2015.
  25. Guo W, Zhu L, Zhu R, Chen Q, Wang Q, Chen JQ. A four-DNA methylation biomarker is a superior predictor of survival of patients with cutaneous melanoma. *Elife*. 2019; 8: e44310. DOI: 10.7554/eLife.44310.
  26. de Ruijter TC, van der Heide F, Smits KM, Aarts MJ, van Engeland M, Heijnen VCG. Prognostic DNA methylation markers for hormone receptor breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res*. 2020; 22 (1): 13. DOI: 10.1186/s13058-020-1250-9.
  27. Dai JB, Zhu B, Lin WJ, Gao HY, Dai H, Zheng L, et al. Identification of prognostic significance of BIRC5 in breast cancer using integrative bioinformatics analysis. *Biosci Rep*. 2020; 40 (2): BSR20193678. DOI: 10.1042/BSR20193678.
  28. Jiang S, Bu X, Tang D, Yan C, Huang Y, Fang K. A tumor suppressor gene-based prognostic classifier predicts prognosis, tumor immune infiltration, and small molecule compounds in breast cancer. *Front Genet*. 2022; 12: 783026. DOI: 10.3389/fgene.2021.783026.
  29. Mohamadalizadeh-Hanjani Z, Shahbazi S, Geranpayeh L. Investigation of the SPAG5 gene expression and amplification related to the NuMA mRNA levels in breast ductal carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2020; 18 (1): 225. DOI: 10.1186/s12957-020-02001-8.
  30. Linares A, Assou S, Lapierre M, Thouennon E, Duraffourd C, Fromaget C, et al. Increased expression of the HDAC9 gene is associated with antiestrogen resistance of breast cancers. *Mol Oncol*. 2019; 13 (7): 1534–47. DOI: 10.1002/1878-0261.
  31. Li Y, Huang J, Sun J, Xiang S, Yang D, Ying X, et al. The transcription levels and prognostic values of seven proteasome alpha subunits in human cancers. *Oncotarget*. 2017 Jan 17; 8 (3): 4501–19. DOI: 10.18632/oncotarget.13885.

## ПОЛИМОРФИЗМЫ RS17713054 И RS1800629 ГЕНОВ *LZTFL1* И *TNF* АССОЦИИРОВАНЫ С ТЯЖЕСТЬЮ ТЕЧЕНИЯ COVID-19

А. А. Траспов<sup>1</sup>, М. М. Минашкин<sup>1</sup>, С. В. Поярков<sup>1</sup>, А. Г. Комаров<sup>2</sup>, И. А. Штинова<sup>2</sup>, Г. И. Спешилов<sup>2</sup>, И. А. Карбышев<sup>2</sup>, Н. В. Позднякова<sup>1</sup>✉, М. А. Годков<sup>3</sup>

<sup>1</sup> «Система-БиоТех», Москва, Россия

<sup>2</sup> Диагностический центр (Центр лабораторных исследований) Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н. В. Склифосовского

Генетические и негенетические факторы ответственны за высокую межиндивидуальную вариабельность ответа на SARS-CoV-2. Хотя многочисленные генетические полиморфизмы были идентифицированы как факторы риска тяжелого течения COVID-19, они остаются недостаточно изученными в российской популяции. Целью данного исследования было выявить генетические детерминанты, ассоциированные с тяжелым течением COVID-19 на выборке пациентов из Российской Федерации. Проведена оценка связи генетических полиморфизмов rs17713054 в гене *LZTFL1* и rs1800629 в гене *TNF* (фактор некроза опухоли) с тяжестью COVID-19. Были исследованы образцы ДНК 713 пациентов (324 мужчины и 389 женщины) возрастом 18–95 лет с COVID-19, протекавшей с разной степенью тяжести. Идентифицированы rs1800629 *TNF* (OR = 1,5;  $p = 0,02$ ) и rs17713054 *LZTFL1* (OR = 1,60;  $p = 0,0043$ ) как факторы риска тяжелого течения. Полиморфизмы *TNF* rs1800629 и *LZTFL1* rs17713054 могут быть потенциальным предиктивным и предиктивным биомаркерами. Показана сильная ассоциация rs17713054 G > A с тяжелым течением. Полученные данные могут в дальнейшем стать основой для разработки тест-систем предсказания рисков тяжести течения вирусных заболеваний респираторного тракта.

**Ключевые слова:** COVID-19, SARS-CoV-2, SNP, *LZTFL1*, *TNF*, тяжесть течения, генетические детерминанты

**Финансирование:** исследование профинансировано главным акционером компании ООО «Система-БиоТех», АФК «Система». Исследование профинансировано в рамках двойного слепого клинического исследования Департаментом здравоохранения г. Москвы

**Благодарности:** авторы благодарят заместителя руководителя Департамента здравоохранения г. Москвы Ю. О. Антипова за организацию исследования; за предоставление образцов биологических материалов пациентов ГБУЗ «Диагностический центр (Центр лабораторных исследований) г. Москвы».

**Вклад авторов:** Н. В. Позднякова, С. В. Поярков — концепция и дизайн исследования; М. М. Минашкин — выполнение молекулярно-генетических работ, лабораторная постановка; С. В. Поярков, А. А. Траспов — обзор литературы, написание статьи; А. А. Траспов — статистическая обработка и редактирование статьи; А. Г. Комаров — руководство, планирование эксперимента, анализ данных; И. А. Штинова, Г. И. Спешилов и И. А. Карбышев — предоставление клинического материала и метаданных; М. А. Годков — контроль за сбором образцов, предоставление обезличенных данных.

**Соблюдение этических стандартов:** одобрение этического комитета не требовалось в связи с работой с обезличенными данными пациентов и двойным слепым форматом исследования.

✉ Для корреспонденции: Наталья Вячеславовна Позднякова  
1-я Курьяновская ул., д. 34, корп. 11, Москва, Россия; n.pozdnyakova@sistemabiotech.ru

Статья получена: 18.11.2022 Статья принята к печати: 14.12.2022 Опубликована онлайн: 28.12.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.065

## THE RS17713054 AND RS1800629 POLYMORPHISMS OF GENES *LZTFL1* AND *TNF* ARE ASSOCIATED WITH COVID-19 SEVERITY

Trasnov AA<sup>1</sup>, Minashkin MM<sup>1</sup>, Poyarkov SV<sup>1</sup>, Komarov AG<sup>2</sup>, Shtinova IA<sup>2</sup>, Speshilov GI<sup>2</sup>, Karbyshev IA<sup>2</sup>, Pozdnyakova NV<sup>1</sup>✉, Godkov MA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Sistema BioTech LLC, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Diagnostic Center (Center of Laboratory Testing) of the Moscow Department of Health, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russia

Both genetic and non-genetic factors are responsible for high interindividual variability in response to SARS-CoV-2. Despite the fact that multiple genetic polymorphisms have been identified as risk factors of severe COVID-19, such polymorphisms are still insufficiently studied in the Russian population. The study was aimed to identify genetic determinants associated with severe COVID-19 in the sample of patients from the Russian Federation. The correlation of the rs17713054 polymorphism in gene *LZTFL1* and rs1800629 polymorphism in gene *TNF* (tumor necrosis factor) with the COVID-19 severity was assessed. DNA samples obtained from 713 patients (324 males and 389 females) aged 18–95 with COVID-19 of varying severity were analyzed. The rs1800629 polymorphism of gene *TNF* (OR = 1.5;  $p = 0.02$ ) and rs17713054 polymorphism of gene *LZTFL1* (OR = 1.60;  $p = 0.0043$ ) were identified as risk factors of severe disease. The *TNF* polymorphism rs1800629 and *LZTFL1* polymorphism rs17713054 could be considered as potential predictive biomarkers. The rs17713054 G > A polymorphism was strongly associated with severe disease. In the future the findings may provide the basis for the development of test-systems for prediction of the risk of severe viral respiratory diseases.

**Keywords:** COVID-19, SARS-CoV-2, SNP, *LZTFL1*, *TNF*, severity, genetic determinants

**Funding:** the study was supported by the major Sistema BioTech LLC shareholder, the Sistema Public Joint Stock Financial Corporation. The study was funded by the Moscow Department of Health as part of the double blind clinical trial.

**Acknowledgements:** the authors express their gratitude to Antipova YuO, Deputy Head of the Moscow Department of Health, for organizing the blind clinical trial of COVID-19 severity and the patients of the Diagnostic Center (Center of Laboratory Testing) of the Moscow Department of Health for the provided biomaterial samples.

**Author contribution:** Pozdnyakova NV, Poyarkov SV — study concept and design; Minashkin MM — molecular genetic research, laboratory tests; Poyarkov SV, Trasnov AA — literature review, manuscript writing; Trasnov AA — statistical processing of the results, manuscript editing; Komarov AG — project management, planning the experiment, data analysis; Shtinova IA, Speshilov GI, Karbyshev IA — providing clinical data and metadata; Godkov MA — control over clinical sample collection at the Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, providing anonymized data.

**Compliance with ethical standards:** the study did not need to be approved by the Ethics Committee because of dealing with anonymized patient data and the double blind study format.

✉ Correspondence should be addressed: Natalia V. Pozdnyakova  
1 Kurjanovskaja, 34, korp. 11, Moscow, Russia; n.pozdnyakova@sistemabiotech.ru

Received: 18.11.2022 Accepted: 14.12.2022 Published online: 28.12.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.065



За последние десятилетия было показано, что вариации генома человека способствуют возникновению гетерогенности в ответ на инфекционные заболевания.

Пандемия тяжелого острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом SARS-CoV-2, привела к гибели миллионов людей во всем мире.

Для заболевания, вызванного новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), характерна высокая вариабельность клинических проявлений (Всемирная организация здравоохранения, 2021 г.). Большинство пациентов, а именно 81%, имеют бессимптомное или легкое течение, тогда как 14% страдают тяжелым и 5% — критическим течением заболевания [1]. Наиболее распространенные симптомы включают лихорадку, сухой кашель и утомляемость; наблюдаются также агевзия, аносмия и желудочно-кишечные симптомы. Для тяжелой формы COVID-19 характерна дыхательная недостаточность, требующая искусственной вентиляции легких или интенсивной подачи кислорода.

Идет постоянный поиск факторов риска, которые могут быть связаны с болезнью. Изначально предполагалось, что люди пожилого возраста, мужского пола, имевшие ранее сердечно-сосудистые заболевания, заболевают в тяжелой форме. Но оказалось, что генетический бэкграунд вносит не меньший вклад. В результате многочисленных исследований было показано, что полиморфизмы в генах факторов организма-хозяина, необходимых для реализации жизненного цикла вируса, например *ACE2*, *TMPRSS2*, *AR*, а также в генах, задействованных во врожденном иммунном ответе, например *TNF*, *TLR7*, могут быть связаны с тяжестью COVID-19 [2].

Первое полногеномное ассоциативное исследование (GWAS) тяжести течения COVID-19, в котором сравнивались 1980 пациентов с тяжелым течением из Италии и Испании с контрольной популяцией с неизвестным статусом инфекции SARS-CoV-2, выявил два значимых для всего генома локуса, картируемых в области 3p21.31, включающей шесть генов (*SLC6A26*, *LZTFL1*, *CXCR6*, *CCR1*, *CCR3*, *CCR9*) и в области 9q34.2, которая содержит локус группы крови ABO [3].

Сигнал в локусе 3p21.31 остается наиболее устойчивым и сильным во множестве исследований, что связано как с восприимчивостью к инфекции, так и с тяжестью заболевания. Аллель C варианта rs10490770 связан с самым сильным увеличением риска тяжелого течения пневмонии COVID-19 в данном локусе [4].

В полногеномно-ассоциативных исследованиях (Genome-Wide Association Studies, GWAS) было выявлено, что область 3p21.31 связана с двукратным увеличением риска появления дыхательной недостаточности [5].

Роль факторов хозяина, определяющих как чувствительность так и тяжесть течения инфекции, показана для многих патогенов, включая микобактерии туберкулеза, HIV, *Candida albicans* и многих других [6].

Известна ассоциация риска тяжелого течения инфекции с генами, вовлеченными в иммунный и воспалительный ответы. Так, известна роль минорных аллелей в *TLR7* [7] и в генах системы интерферона [8].

Помимо аллелей риска, существуют варианты, которые обладают защитным эффектом. Так, генотип TT SNP rs5443 в гене *GNB3* ассоциирован с защитой от летального исхода при COVID-19 [9]. Полиморфизмы в регуляторных регионах генов провоспалительных цитокинов, которые могут влиять на уровень экспрессии мРНК этих генов, например C-572G rs1800796 в промоторном регионе гена

IL6, ассоциирован с защитным эффектом от развития тяжелого течения и смерти от COVID-19 в популяции народов Азии [10].

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Клинико-демографические характеристики обследованных пациентов.

В исследование были включены пациенты отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, ГКБ № 1 ОО «Медси», ГКБ № 40, а также сотрудники АФК «Система» и лаборатории «Система-БиоТех». Было проведено ретроспективное исследование (исход заболевания был известен), в которое включили 713 пациентов ( $n = 713$ ). Критерии включения: коронавирусная инфекция различной степени тяжести. Критерии исключения: наличие различных типов коморбидности, способных резко повлиять на общее состояние пациента (онкология, ИБС, дефекты иммунитета).

Для выявления ассоциации исследуемых вариантов с тяжелым и крайне тяжелым течением пациенты были разделены на две группы: группу контроля, куда были включены две категории (пациенты с легким и средне-тяжелым течением), и опыта (пациенты с тяжелым течением) в соответствии со шкалой визуальной оценки легких по результатам компьютерной томографии (или МСКТ), разработанной во время пандемии новой коронавирусной инфекции специалистами из Центра диагностики и телемедицины США, после изучения КТ-исследований 13 003 человек, которые составили основную выборку. Данная классификация получила широкое распространение и в российской практике [24]. Критерием степени тяжести служили данные компьютерной томографии (КТ) легких: для контрольной группы — КТ1 и 2, для тяжелой — КТ3 и 4. Основные признаки исследуемой когорты представлены в табл. 1.

## Выделение геномной ДНК

В качестве биологического материала для выделения геномной ДНК использовали венозную кровь, стабилизированную ЭДТА.

ДНК выделяли с помощью набора для выделения ДНК из цельной крови DiaGene («Диа-М»; Россия). Чистоту выделенной НК проверяли на спектрофотометре NanoDrop OneC (Thermo FS; США). Соотношение A260/280 колебалось от 1,8 до 1,91, а соотношение A260/230 — от 1,62 до 2,28. Концентрацию ДНК измеряли с помощью набора dsDNA BR на флуориметре Qubit Flex (Thermo FS; США). Ее значения менялись в пределах 15–300 нг/мкл. Концентрацию всех образцов ДНК доводили до 2 нг/мкл.

## Генотипирование ДНК

Генотипирование ДНК в области исследуемых полиморфных маркеров проводили методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентной детекцией с использованием наборов для генотипического анализа TaqMan SNP (Thermo FS; США). ПЦР проводили на амплификаторе CFX96 (BioRad; США).

Генотипировали ряд маркеров, который в дальнейшем подтверждали секвенированием по методу Сэнгера. Праймеры были разработаны с использованием PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (по состоянию на 24 сентября 2020 г.)). В реакции

**Таблица 1.** Основные параметры возраста и пола, взятые для исследования. Классифицировано на две группы по степени тяжести (группа «контроль» и группа «тяжелые»), по полу и возрасту

	<i>n</i> = 713	
	Группа «контроль»	Группа «тяжелые»
Всего	373 (52,31%)	340 (47,69%)
МУЖЧИНЫ	154 (41%)	170 (50%)
ЖЕНЩИНЫ	219 (59%)	170 (50%)
Возраст	21–94	18–95

циклического секвенирования BigDye Terminator v3.1 использовали набор для циклического секвенирования BigDye (Thermo FS; США); секвенирование проводили на Genetic Analyzer 3500 (Thermo FS; США).

### Статистическая обработка полученных данных

Для расчета статистической значимости различий частот встречаемости использовали точный двусторонний критерий Фишера и критерий  $\chi^2$  (хи-квадрат). Расчеты проводили как для минорного аллеля (AA против Aa+aa; доминантная модель), так и для гомозиготных генотипов по минорному аллелю (AA+Aa против aa; рецессивная модель). Для групп, в которых были обнаружены значимые различия, рассчитывали отношение шансов (OR), 95%-й доверительный интервал (CI) и критерий статистической значимости. Расчеты проводились с использованием ресурса SNPStats (<https://www.snpsstats.net/> (по состоянию на 20 сентября 2021 г.)), которое предназначено для выявления связи между однонуклеотидными полиморфизмами и риском заболевания. Для оценки влияния множественных сравнений для значений OR статистически значимых полиморфизмов была проведена поправка Холма–Бонферрони. Были проанализированы выборки, включая все полиморфизмы, на достаточность размера выборки. Анализ проводили в пакете Statsoft Statistica 12. Чтобы проанализировать требуемый размер выборки при заданной силе 80, мы использовали независимый *t*-тест с 2 выборками для сравнения двух средних значений между двумя популяциями (нулевая гипотеза  $\mu_1 = \mu_2$ ). Учитывали особенности пакета SNPstats и используемые в нем величины: средние с критериями Акаике (AIC) и Байесовским информационным критерием (Bayesian information criterion, BIC).

**Таблица 2.** SNP, используемые в модели оценки риска тяжести течения в двух группах (контрольная и опытная)

Ген/SNP	Доминантная модель (AA против Aa+aa)			Рецессивная модель (AA+Aa против aa)		
	OR (95% CI)	ДИ	<i>P</i> -value	OR (95% CI)	ДИ	<i>P</i> -value
<i>TNF</i> /rs1800629	1,5	1,06–2,12	0,02	1,1	0,35–3,44	0,87
<i>IFIH1</i> /rs1990760	1,2	0,88–1,63	0,26	1,4	0,98–2,01	0,07
<i>IFITM3</i> /rs12252	0,87	0,55–1,38	0,56	1,66	0,46–5,92	0,43
<i>CCR2</i> /rs1799864	1,27	0,91–1,78	0,16	1,33	0,57–3,11	0,51
<i>STAT3</i> /rs744166	0,94	0,70–1,27	0,71	0,53	0,32–0,88	0,01
<i>STAT6</i> /rs324011	0,93	0,68–1,26	0,62	1,17	0,75–1,81	0,48
<i>TLR2</i> /rs1898830	0,72	0,53–0,98	0,04	0,73	0,48–1,11	0,13
<i>C3AR1</i> /rs7842	1,13	0,84–1,52	0,41	1,37	0,77–2,42	0,28
<i>TMPRSS2</i> /rs75603675	1,23	0,90–1,68	0,19	0,85	0,57–1,27	0,43
<i>LZTFL1</i> /rs17713054	1,6	1,16–2,21	0,0043	4,56	1,51–13,76	0,0025

**Примечание:** значения ДИ присутствуют только для отношений шансов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В табл. 1 описана исследуемая выборка с целью оценки ее разнообразия.

Для расчета статистической значимости разницы в частотах встречаемости использовали точный двусторонний критерий Фишера и  $\chi^2$ -критерий. Статистические расчеты проводили в соответствии с доминантной моделью (с идентификацией аллеля риска) и рецессивной моделью (с идентификацией генотипа риска). Кроме того, для групп, в которых были обнаружены значимые различия, рассчитывали отношение шансов (OR), с 95%-м доверительным интервалом и критерием статистической значимости *p*.

Для всех полиморфизмов был сделан (в зависимости от разделения пациентов на группы) расчет статистической значимости с использованием двух моделей: доминантной и рецессивной. Модель базировалась на оценке риска перехода легкой формы в более тяжелую; частоту сравнивали у пациентов контрольной группы, с одной стороны, и у пациентов с тяжелой формой, с другой (табл. 2).

Поскольку в эксперименте проверяли большое количество гипотез на одном и том же наборе данных, из-за эффекта множественных сравнений была внесена поправка Холма–Бонферрони, чтобы избежать ошибок I типа.

Для двух маркеров наличие минорной аллели и гомозиготного генотипа было связано с повышенным риском тяжелого течения заболевания. Это rs1800629 в гене *TNF* (OR = 1,5; *p* = 0,02), и rs17713054 в гене *LZTFL1* (OR = 1,60; *p* = 0,0043), однако rs17713054 показал патогенные свойства и в рецессивной модели (OR = 4,56; *p* = 0,0025).

**Таблица 3.** Расчет частот встречаемости 10 изученных маркеров по доминантной и рецессивной моделям (Allele frequency), частот генотипов НОМ1/НЕТ/НОМ2 (Genotype distribution), а также достоверность отклонения по Харди–Вайнбергу (HWE  $p$ -value). Все исследование проводили на экспериментальной ( $n = 340$ ), контрольной ( $n = 373$ ) и объединенной группах ( $n = 713$ )

Группа «контроль» в сравнении с группой «тяжелые»									
Ген/Аллельные варианты	Частота аллеля			Распределение генотипов			Отклонение по Харди–Вайнбергу, $P$ -value		
	все	контроль	опыт	все	контроль	опыт	все	контроль	опыт
<i>TNF</i> (G/A)	0,87/0,13	0,89/0,11	0,85/0,15	0,02/0,22/0,76	0,02/0,18/0,8	0,02/0,26/0,73	0,86	0,42	0,83
<i>IFIH1</i> (T/C)	0,57/0,43	0,59/0,41	0,54/0,46	0,21/0,44/0,35	0,18/0,45/0,37	0,24/0,43/0,33	0,0047	0,13	0,016
<i>IFITM3</i> (A/G)	0,93/0,07	0,93/ 0,07	0,94/0,06	0,88/0,11/0,01	0,87/0,12/0,01	0,89/0,09/0,02	0,00053	0,081	0,0012
<i>CCR2</i> (G/A)	0,85/0,15	0,87/0,13	0,84/0,16	0,03/0,23/0,74	0,03/0,21/0,76	0,04/0,25/0,71	0,049	0,12	0,22
<i>STAT3</i> (A/G)	0,66/0,34	0,64/0,36	0,68/0,32	0,42/0,47/0,11	0,42/0,45/0,13	0,43/0,49/0,08	0,24	0,65	0,019
<i>STAT6</i> (C/T)	0,62/ 0,38	0,62/0,38	0,62/0,38	0,37/0,5/0,13	0,36/0,51/0,12	0,38/0,48/0,14	0,13	0,078	0,82
<i>TLR2</i> (A/G)	0,59/0,41	0,57/0,43	0,62/0,38	0,34/0,52/0,15	0,3/0,53/0,17	0,37/0,5/0,13	0,062	0,11	0,25
<i>C3AR1</i> (T/C)	0,72/0,28	0,73/ 0,27	0,71/0,29	0,07/0,42/0,51	0,06/0,41/0,53	0,08/0,42/0,5	0,46	0,43	0,9
<i>TMPRSS2</i> (C/A)	0,59/0,41	0,6/0,4	0,58/ 0,42	0,16/0,5/0,34	0,17/ 0,46/0,36	0,15/0,53/0,32	0,54	0,52	0,094
<i>LZTFL1</i> (C/T)	0,84/0,16	0,87/0,13	0,8/0,2	0,7/0,27/0,03	0,75/0,24/0,01	0,65/0,3/0,05	0,68	0,37	0,39

В маркере *TLR2* защитными свойствами обладал гомозиготный генотип по минорному аллелю в доминантной модели.

Все выявленные маркеры являются факторами риска как для восприимчивости к заболеванию, так и для перехода заболевания в более тяжелую форму, но статистическая значимость была достигнута только для вариантов, проиллюстрированных в таблицах выше.

Кроме того, был также проведен анализ исследуемой выборки на отклонение от распределения равновесия Харди–Вайнберга ( $n = 713$ ), для 10 исследованных маркеров (табл. 3).

На основе суммирования коэффициентов отклонения от равновесия Харди–Вайнберга и их уровней значимости  $P$  было выявлено отклонение от равновесия для *IFIH1* ( $p = 0,0047$ ), *CCR2* ( $p = 0,049$ ) и значительное — для *IFITM3* ( $p = 0,00053$ ).

Таким образом, варианты rs1800629 в гене *TNF* и rs17713054 в гене *LZTFL1* могут быть рассмотрены как потенциальные кандидаты для дальнейшего анализа на расширенных выборках (табл. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашем исследовании мы демонстрируем подтверждающие доказательства участия локуса 3p21.31 человека в патофизиологии заболевания COVID-19 с использованием независимой когорты пациентов и контрольной группы населения Российской Федерации.

Ранее нами были проанализированы распределение 10 SNP и их ассоциация с тяжестью течения [11]. В настоящей работе, проведенной на большей выборке и с расширенным набором полиморфизмов, исключен полиморфизм в *TLR7* и добавлен полиморфизм *LZTFL1* и

**Таблица 4.** Расчет уровней статистической значимости в различиях между группами опыта и контроля в 10 исследованных полиморфизмах

Ген/SNP	Аллель	Опыт	Контроль	$P$ -value	Отношения шансов	ДИ
<i>TNF</i> /rs1800629	G	665	581	0,03801	1,398585	1,009831–1,941277
	A	81	99			
<i>IFIH1</i> /rs1990760	T	442	370	0,06881	1,217995	0,9818877–1,5111842
	C	304	310			
<i>IFITM3</i> /rs12252	A	695	636	0,8319	0,9427985	0,6060591–1,4617779
	G	51	44			
<i>CCR2</i> /rs1799864	G	647	571	0,1536	1,247354	0,9192725–1,6940554
	A	99	109			
<i>STAT3</i> /rs744166	A	478	460	0,1627	0,8531148	0,6806029–1,0687811
	G	268	220			
<i>STAT6</i> /rs1898830	C	464	423	1	0,999678	0,8020877–1,2457747
	T	282	257			
<i>TLR2</i> /rs1898830	A	423	424	0,03094	0,7908369	0,6357947–0,9831671
	G	323	256			
<i>C3AR1</i> /rs7842	T	547	481	0,2877	1,137109	0,8959515–1,4432459
	C	199	199			
<i>TMPRSS2</i> /rs75603675	C	445	397	0,628	1,053809	0,8482685–1,3092215
	A	301	283			
<i>LZTF1</i> /rs17713054	C	649	546	0,0007003	1,641442	1,223191–2,208574
	T	97	134			

обнаружено, что всего два полиморфизма в генах *LZTFL1* и *TNF* показывают сильную ассоциацию с тяжелым течением COVID-19.

Среди проанализированных полиморфизмов только два убедительно ассоциированы с тяжестью течения. Интересно отметить, что после расширения выборки до 713 пациентов результаты для части полиморфизмов из раннего исследования [11] оказались статистически незначимыми. Тем не менее сильный сигнал был обнаружен в rs17713054 (ген *LZTFL1*, локус 3p21.3). Вторым по значимости был rs1800629 в гене *TNF*. Известно, что оба полиморфизма ассоциированы с тяжелым течением COVID-19 и носители минорных аллелей имеют повышенный риск развития тяжелого течения COVID-19 [12]. Полиморфизм rs17713054 располагается в энхансере, который регулирует экспрессию генов в этом локусе, включая *LZTFL1* и *SLC6A20*, а также гены хемокинов.

Этот полиморфизм приводит к появлению нового сайта связывания для транскрипционного фактора C/EBP beta, что приводит к повышению экспрессии *LZTFL1* и соседних генов в этом локусе [13]. Ген *LZTFL1* участвует в цилиарной функции клеток эпителия легких, что важно для очистки дыхательных путей от вирусов [14].

*LZTFL1* широко экспрессируется в эпителиальных клетках легких, включая реснитчатые эпителиальные клетки, которые были идентифицированы как одна из основных клеточных мишеней для инфекции SARS-CoV-2. Кроме того, гомозиготная потеря *LZTFL1* вызывает классическую цилиопатию: синдром Барде-Бидля [15]; известно, что респираторные вирусы могут воздействовать на мукоцилиарный клиренс. *LZTFL1* кодирует цитозольный белок с мотивом лейциновой застёжки, который связывается с E-кадгерин (эпителиальным маркером) и участвует в переносе многочисленных сигнальных молекул. Известно также, что активация *LZTFL1* в контексте злокачественных новообразований ингибирует путь эпителиально-мезенхимального перехода (EMT), который, как известно, является частью как механизма заживления ран, так и иммунного ответа [16]. Исследование посмертных биоптатов легких пациентов, умерших от осложнений COVID-19, демонстрирует широко распространенную эпителиальную дисфункцию с признаками EMT [13]. Сигнал в локусе 3p21.31 остается наиболее устойчивым и сильным по данным нескольких исследований, что связано как с восприимчивостью к инфекции, так и с тяжестью заболевания [17].

Показано, что аллель риска rs17713054 A в энхансере гена *LZTFL1*, в значительной степени ответственен за двукратное увеличение риска дыхательной недостаточности от COVID-19, связанного с 3p21.31 [13]. *LZTFL1* широко экспрессируется в эпителиальных клетках легких, включая реснитчатые эпителиальные клетки, которые были идентифицированы как одна из основных клеточных мишеней для инфекции SARS-CoV-2 [18].

Анализ других полиморфизмов гена *LZTFL1*, таких как rs11385942, показал повышенный риск госпитализации ( $p < 0,01$ ; OR = 5,73; 95% CI: 1,2–26,5 по аллельному тесту) в колумбийской [19] и в латышской [20] популяциях; интронный вариант rs35280891 ( $p = 6,88 \times 10^{-7}$ ; OR = 19,846, 95% CI: 5,728–68,761,) ассоциирован с тяжелым течением в сербской популяции [21].

Интересно отметить, что минорный аллель A rs17713054 является частью расширенного гаплотипа, унаследованного от неандертальцев. На сегодняшний

день этот гаплотип представляет собой основной генетический фактор риска, связанный с тяжелыми симптомами после заражения SARS-CoV-2. Различия в частоте гаплотипа риска у населения Южной и Восточной Азии привели к предположению, что некое селективное давление, возможно, связанное с холерой, привело к его распространению среди жителей Южной Азии [22].

В нашем исследовании мы подтвердили сильную ассоциацию rs17713054 с тяжелым течением (OR = 4,56;  $p = 0,0025$ ) в рецессивной модели.

Было также показано, что во всех вариантах выборок как минорный аллель варианта rs1800629 в гене *TNF* — T, так и минорный генотип TT являются фактором риска развития тяжелой формы при значениях OR = 1,5;  $p = 0,02$ .

Известно, что вариант rs1800629 гена *TNF* связан с необходимостью респираторной поддержки и ее большей продолжительностью у пациентов с COVID-19 [23]. Кроме патогенных вариантов нами был также обнаружен rs1898830 в гене *TLR2* с протективным действием (OR = 0,72).

Проведя исследование ассоциации 10 SNP, мы обнаружили, что два полиморфизма обладают достаточной силой для оценки рисков тяжелого течения.

Проведено исследование ассоциации *LZTFL1* rs17713054 в РФ на сбалансированной выборке пациентов с тяжелым и легким течением, показавшим убедительную ассоциацию с тяжестью течения. Это подтверждает гипотезу о функциональном значении данного полиморфизма.

Простой, быстрый и недорогой тест, направленный на прогнозирование рисков тяжелого течения COVID-19 на основе индивидуальных полиморфизмов ДНК, был бы полезен как для стратификации пациентов с высоким и низким риском осложнений, а также, что более важно, для оценки тяжести заболевания в популяции здоровых людей в случаях инфицирования и последующего заболевания как перспективный прогностический тест.

## ВЫВОДЫ

В генетическом исследовании выборки из 713 пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 были найдены ключевые SNP в генах *TNF* и *LZTFL1*, связанные с тяжелым течением заболевания. Охарактеризован новый генетический маркер в гене *LZTFL1*, прогностическая ценность которого составила более 91%. Отклонения частот ассоциированных с рисками тяжелого течения COVID-19 генетических полиморфизмов от равновесия Харди-Вайнберга имеют важное эпидемиологическое значение и требуют дальнейшего изучения. Варианты rs1800629 в гене *TNF* и rs17713054 в гене *LZTFL1* могут быть рассмотрены как потенциальные кандидаты для дальнейшего анализа на расширенных выборках. На основании проведенного клинического исследования можно сделать ряд выводов для дальнейшей клинической практики. Общий поток пациентов, поступающих в клиники с диагнозом острой респираторной коронавирусной инфекции, гетерогенен и на ранних этапах может быть разделен на группы пациентов с потенциально легким течением и потенциально тяжелым течением заболевания по факту наличия или отсутствия в генотипе пациента выбранных полиморфизмов *TNF* rs1800629 и *LZTFL1* rs17713054. Полиморфизмы в генах *LZTFL1* и *TNF* могут быть использованы не только как прогностические биомаркеры, но и как предиктивные и представлять собой научное обоснование новых подходов в генотип-ориентированной терапии больных с тяжелым поражением



легких, связанным с COVID-19. Настоящее исследование предполагает перспективную возможность организации

скрининговых исследований с очевидной экономической доступностью и эффективностью.

## Литература

1. Hu B, et al., Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19 (3): 141–54.
2. Gupta K, et al., Systematic review and meta-analysis of human genetic variants contributing to COVID-19 susceptibility and severity. *Gene.* 2022; 844: 146790.
3. Severe Covid GG, et al., Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med.* 2020; 383 (16): 1522–34.
4. Colona VL, Vasiliou V, Watt J, Novelli G, Reichardt JKV. Update on human genetic susceptibility to COVID-19: susceptibility to virus and response. *Hum Genomics.* 2021; 15 (1): 57.
5. Nakanishi T, Pigazzini S, Degenhardt F, Cordioli M, Butler-Laporte G, Maya-Miles D, et al. Age-dependent impact of the major common genetic risk factor for COVID-19 on severity and mortality. *J Clin Invest.* 2021; 131 (23): e152386.
6. Kwok AJ, Mentzer A, Knight JC. Host genetics and infectious disease: new tools, insights and translational opportunities. *Nat Rev Genet.* 2021; 22 (3): 137–53.
7. El-Hefnawy SM, et al, COVID-19 susceptibility, severity, clinical outcome and Toll-like receptor (7) mRNA expression driven by TLR7 gene polymorphism (rs3853839) in middle-aged individuals without previous comorbidities. *Gene Rep.* 2022; 27: 101612.
8. Casanova JL, Abel L. From rare disorders of immunity to common determinants of infection: Following the mechanistic thread. *Cell.* 2022; 185 (17): 3086–103.
9. Mohlendick B, et al. The GNB3 c.825C>T (rs5443) polymorphism and protection against fatal outcome of corona virus disease 2019 (COVID-19). *Front Genet.* 2022; 13: 960731.
10. Chen T, et al. A Low-Producing Haplotype of Interleukin-6 Disrupting CTCF Binding Is Protective against Severe COVID-19. *mBio.* 2021; 12 (5): e0137221.
11. Minashkin MM, et al. The Role of Genetic Factors in the Development of Acute Respiratory Viral Infection COVID-19: Predicting Severe Course and Outcomes. *Biomedicine.* 2022; 10 (3).
12. Fricke-Galindo I, Buendía-Roldán I, Ruiz A, Palacios Y, Pérez-Rubio G, de Jesus Hernández-Zenteno R, et al. TNFRSF1B and TNF Variants Are Associated With Differences in Levels of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors in Patients With Severe COVID-19. *J Infect Dis.* 2022; 226 (5): 778–87.
13. Downes DJ, et al. Identification of LZTFL1 as a candidate effector gene at a COVID-19 risk locus. *Nat Genet.* 2021; 53 (11): 1606–15.
14. Fink-Balduf IM, et al. CRISPRi links COVID-19 GWAS loci to LZTFL1 and RAB11. *EBioMedicine.* 2022; 75: 103806.
15. Marion V, et al., Exome sequencing identifies mutations in LZTFL1, a BBSome and smoothened trafficking regulator, in a family with Bardet-Biedl syndrome with situs inversus and insertional polydactyly. *J Med Genet.* 2012; 49 (5): 317–21.
16. Stewart CA, Gay CM, Ramkumar K, Cargill KR, Cardnell RJ, Nilsson MB, et al. Lung Cancer Models Reveal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to Coronavirus Disease 2019 Pathophysiology. *J Thorac Oncol.* 2021; 16 (11): 1821–39.
17. Redin C, CW. Thorball, and J. Fellay, Host genomics of SARS-CoV-2 infection. *Eur J Hum Genet.* 2022; 30 (8): 908–14.
18. Wei Q, Chen ZH, Wang L, Zhang T, Duan L, Behrens C, et al. LZTFL1 suppresses lung tumorigenesis by maintaining differentiation of lung epithelial cells. *Oncogene.* 2016; 35 (20): 2655–63.
19. Angulo-Aguado M, et al., Association Between the LZTFL1 rs11385942 Polymorphism and COVID-19 Severity in Colombian Population. *Front Med (Lausanne).* 2022; 9: 910098.
20. Rescenko R, et al. Replication of LZTFL1 Gene Region as a Susceptibility Locus for COVID-19 in Latvian Population. *Virology.* 2021; 36 (5): 1241–4.
21. Zecevic M, et al. Genome-Wide Association Study of COVID-19 Outcomes Reveals Novel Host Genetic Risk Loci in the Serbian Population. *Front Genet.* 2022; 13: 911010.
22. Niemi MEK, Daly MJ, Ganna A. The human genetic epidemiology of COVID-19. *Nat Rev Genet.* 2022; 23 (9): 533–46.
23. Fishchuk L, et al. Modifying effects of TNF- $\alpha$ , IL-6 and VDR genes on the development risk and the course of COVID-19. Pilot study. *Drug Metab Pers Ther.* 2021; 37 (2): 133–9.
24. Kudryavtsev YS, Beregov MM, Berdalin AB, Lelyuk VG. Comparison of the Main Staging Systems for Assessing the Severity of Lung Injury in Patients with COVID-19 and Evaluation of Their Predictive Value. *Journal of radiology and nuclear medicine.* 2021; 102 (5): 296–303.

## References

1. Hu B, et al., Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19 (3): 141–54.
2. Gupta K, et al., Systematic review and meta-analysis of human genetic variants contributing to COVID-19 susceptibility and severity. *Gene.* 2022; 844: 146790.
3. Severe Covid GG, et al., Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med.* 2020; 383 (16): 1522–34.
4. Colona VL, Vasiliou V, Watt J, Novelli G, Reichardt JKV. Update on human genetic susceptibility to COVID-19: susceptibility to virus and response. *Hum Genomics.* 2021; 15 (1): 57.
5. Nakanishi T, Pigazzini S, Degenhardt F, Cordioli M, Butler-Laporte G, Maya-Miles D, et al. Age-dependent impact of the major common genetic risk factor for COVID-19 on severity and mortality. *J Clin Invest.* 2021; 131 (23): e152386.
6. Kwok AJ, Mentzer A, Knight JC. Host genetics and infectious disease: new tools, insights and translational opportunities. *Nat Rev Genet.* 2021; 22 (3): 137–53.
7. El-Hefnawy SM, et al, COVID-19 susceptibility, severity, clinical outcome and Toll-like receptor (7) mRNA expression driven by TLR7 gene polymorphism (rs3853839) in middle-aged individuals without previous comorbidities. *Gene Rep.* 2022; 27: 101612.
8. Casanova JL, Abel L. From rare disorders of immunity to common determinants of infection: Following the mechanistic thread. *Cell.* 2022; 185 (17): 3086–103.
9. Mohlendick B, et al. The GNB3 c.825C>T (rs5443) polymorphism and protection against fatal outcome of corona virus disease 2019 (COVID-19). *Front Genet.* 2022; 13: 960731.
10. Chen T, et al. A Low-Producing Haplotype of Interleukin-6 Disrupting CTCF Binding Is Protective against Severe COVID-19. *mBio.* 2021; 12 (5): e0137221.
11. Minashkin MM, et al. The Role of Genetic Factors in the Development of Acute Respiratory Viral Infection COVID-19: Predicting Severe Course and Outcomes. *Biomedicine.* 2022; 10 (3).
12. Fricke-Galindo I, Buendía-Roldán I, Ruiz A, Palacios Y, Pérez-Rubio G, de Jesus Hernández-Zenteno R, et al. TNFRSF1B and TNF Variants Are Associated With Differences in Levels of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors in Patients With Severe COVID-19. *J Infect Dis.* 2022; 226 (5): 778–87.
13. Downes DJ, et al. Identification of LZTFL1 as a candidate effector gene at a COVID-19 risk locus. *Nat Genet.* 2021; 53 (11): 1606–15.

14. Fink-Baldauf IM, et al. CRISPRi links COVID-19 GWAS loci to LZTFL1 and RAVR1. *EBioMedicine*. 2022; 75: 103806.
15. Marion V, et al., Exome sequencing identifies mutations in LZTFL1, a BBSome and smoothened trafficking regulator, in a family with Bardet-Biedl syndrome with situs inversus and insertional polydactyly. *J Med Genet*. 2012; 49 (5): 317–21.
16. Stewart CA, Gay CM, Ramkumar K, Cargill KR, Cardnell RJ, Nilsson MB, et al. Lung Cancer Models Reveal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to Coronavirus Disease 2019 Pathophysiology. *J Thorac Oncol*. 2021; 16 (11): 1821–39.
17. Redin C, CW. Thorball, and J. Fellay, Host genomics of SARS-CoV-2 infection. *Eur J Hum Genet*. 2022; 30 (8): 908–14.
18. Wei Q, Chen ZH, Wang L, Zhang T, Duan L, Behrens C, et al. LZTFL1 suppresses lung tumorigenesis by maintaining differentiation of lung epithelial cells. *Oncogene*. 2016; 35 (20): 2655–63.
19. Angulo-Aguado M, et al., Association Between the LZTFL1 rs11385942 Polymorphism and COVID-19 Severity in Colombian Population. *Front Med (Lausanne)*. 2022; 9: 910098.
20. Rescenko R, et al. Replication of LZTFL1 Gene Region as a Susceptibility Locus for COVID-19 in Latvian Population. *Virology*. 2021; 36 (5): 1241–4.
21. Zecevic M, et al. Genome-Wide Association Study of COVID-19 Outcomes Reveals Novel Host Genetic Risk Loci in the Serbian Population. *Front Genet*. 2022; 13: 911010.
22. Niemi MEK, Daly MJ, Ganna A. The human genetic epidemiology of COVID-19. *Nat Rev Genet*. 2022; 23 (9): 533–46.
23. Fishchuk L, et al. Modifying effects of TNF-alpha, IL-6 and VDR genes on the development risk and the course of COVID-19. Pilot study. *Drug Metab Pers Ther*. 2021; 37 (2): 133–9.
24. Kudryavtsev YS, Beregov MM, Berdalin AB, Lelyuk VG. Comparison of the Main Staging Systems for Assessing the Severity of Lung Injury in Patients with COVID-19 and Evaluation of Their Predictive Value. *Journal of radiology and nuclear medicine*. 2021; 102 (5): 296–303.

## ТРАНСГЕННЫЕ МЫШИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КИНАЗА-НЕЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫХ КИНАЗ CDK8/19

Н. И. Ставская<sup>1</sup>, Л. А. Ильчук<sup>2</sup>✉, Ю. Д. Окулова<sup>2</sup>, М. В. Кубекина<sup>2</sup>, Е. А. Варламова<sup>2</sup>, Ю. Ю. Силаева<sup>1</sup>, А. В. Брутер<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

Циклин-зависимая транскрипционная киназа CDK8 и ее менее изученный паралог CDK19 регулируют экспрессию зависимых генов посредством нескольких механизмов. CDK8/19 могут напрямую фосфорилировать некоторые транскрипционные факторы (ICN, STAT1), но в то же время в составе медиаторного комплекса эти киназы регулируют транскрипцию за счет взаимодействия с хроматином в области промоторов и энхансеров соответствующих генов. В последнее время появляются работы, демонстрирующие путем сравнения эффектов генетической инактивации и химического ингибирования киназной активности наличие у CDK8/19 киназа-независимых механизмов действия. Целью работы было получить трансгенных мышей, способных к индуцируемой и тканеспецифичной экспрессии киназонегативной (лишенной фосфорилирующей активности) формы CDK8 — CDK8 (D173A), которых впоследствии можно будет использовать для изучения киназа-независимых механизмов действия CDK8 *in vivo*. Методом случайного трансгенеза в результате микроинъекций линейной ДНК в пронуклеус нами получены четыре трансгенных особи F<sub>0</sub>, две из которых стали родоначальниками отдельных линий. Для всех F<sub>0</sub> и полученных линий измерена копийность интегрировавшейся конструкции. Данная модель может быть использована для изучения киназа-независимых свойств белков CDK8/19.

**Ключевые слова:** трансгенез, регуляция транскрипции, Cdk8, киназа медиатора, киназа-независимые функции

**Финансирование:** грант РНФ#22-15-00227.

**Вклад авторов:** Н. И. Ставская — проведение экспериментов, работа с животными; Л. А. Ильчук — написание рукописи, разработка систем генотипирования, анализ результатов; Ю. Д. Окулова — с эмбрионами; М. В. Кубекина — подготовка генно-инженерной конструкции, проведение экспериментов; Е. А. Варламова — проведение экспериментов; Ю. Ю. Силаева — анализ литературы, планирование исследования; А. В. Брутер — анализ литературы, планирование исследования, анализ и интерпретация результатов, редактирование рукописи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ИБГ РАН (протокол № 1 от 10 ноября 2021 г.) и проведено в строгом соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

✉ **Для корреспонденции:** Леонид Альбертович Ильчук  
проспект Мира, д. 124, г. Москва, 129164, Россия; lechuk12@gmail.com

**Статья получена:** 22.11.2022 **Статья принята к печати:** 19.12.2022 **Опубликована онлайн:** 28.12.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.066

## TRANSGENIC MICE FOR STUDY OF THE CDK8/19 CYCLIN-DEPENDENT KINASE KINASE-INDEPENDENT MECHANISMS OF ACTION

Stavskaya NI<sup>1</sup>, Ilchuk LA<sup>2</sup>✉, Okulova YuD<sup>2</sup>, Kubekina MV<sup>2</sup>, Varlamova EA<sup>2</sup>, Silaeva YuYu<sup>1</sup>, Bruter AV<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The CDK8 cyclin-dependent transcription-associated kinase and its less studied paralog, CDK19, regulate the expression of the dependant genes via several mechanisms. CDK8/19 can directly phosphorylate some transcription factors (ICN, STAT1), but at the same time these kinases being a component of the mediator complex regulate transcription via interaction with chromatin in the promoter and enhancer regions of appropriate genes. Recently the papers have appeared showing that CDK8/19 has kinase-independent mechanisms of action through comparison of the effects of the kinase activity genetic inactivation and chemical inhibition. The study was aimed to generate transgenic mice capable of the induced and tissue-specific expression of the kinase-negative (showing no phosphorylation activity) form of CDK8, CDK8 (D173A), which could be later used to study the CDK8 kinase-independent mechanisms of action *in vivo*. We obtained four F<sub>0</sub> transgenic animals by microinjection of linear DNA into the pronucleus, two of these animals became the ancestors of two distinct lines. The copy number of the integrated construct was measured for all F<sub>0</sub> and the lines generated. This model may be used to study the kinase-independent properties of the CDK8/19 proteins.

**Keywords:** transgenesis, transcription regulation, Cdk8, mediator kinase, kinase-independent functions

**Funding:** RSF grant, project № 22-15-00227.

**Author contribution:** Stavskaya NI — experimental procedure, working with animals; Ilchuk LA — manuscript writing, design of genotyping systems, data analysis; Okulova YuD — working with embryos; Kubekina MV — preparation of genetically engineered construct, experimental procedure; Varlamova EA — experimental procedure; Silaeva YuYu — literature analysis, study planning; Bruter AV — literature analysis, study planning, data analysis and interpretation, manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Gene Biology RAS (protocol № 1 of 10 November 2021) and conducted in full compliance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Leonid A. Ilchuk  
Prospekt Mira, 124, Moscow, 129164, Russia; lechuk12@gmail.com

**Received:** 22.11.2022 **Accepted:** 19.12.2022 **Published online:** 28.12.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.066

Циклин-зависимая киназа CDK8 и ее паралог CDK19 не регулируют напрямую смену фаз клеточного цикла и относятся к так называемым «транскрипционным киназам», регулирующим транскрипцию генов [1]. Механизмы такого

регулирования, однако, разнообразны. С одной стороны, CDK8/19 в составе комплекса с циклином C, MED12 и MED13 напрямую фосфорилируют некоторые транскрипционные факторы, такие как внутриклеточный домен NOTCH [2]

Таблица 1. Использованные олигонуклеотиды

	Последовательность	Назначение
P1	attaaccggtGCACCATGGACTATGACTTTAAAGTGAAG	Амплификация OPC CDK8kd
P2	taatacgcgtTCAGTACCGATGTGTCT	Амплификация OPC CDK8kd
P3	CCATGGGCTTTGCCGATTAT	Внесение мутации A518C
P4	CAGCAATTTTACTCTTCCTCG	Внесение мутации A518C
P5	GTTAGATCTGCTGCCACCGT	Генотипирование (STOP-касета)
P6	AGGTGGCAAGTGGTATTCGG	Генотипирование (STOP-касета)
P7	GCGAGTCCATGTCACTCAGG	Генотипирование (терминатор)
P8	GTGTTGCCCTTTGGAGCTTG	Генотипирование (терминатор)

или STAT1 [3]. С другой стороны, вместе эти четыре белка образуют киназный модуль комплекса Mediator, регулирующего экспрессию генов путем связывания областей промотора и энхансера [1]. И, хотя *in vitro* было показано, что CDK8/19 могут, как транскрипционные киназы CDK7 и CDK9, фосфорилировать С-концевой участок РНК-полимеразы II, что является важным событием в процессе перехода к стадии элонгации, в клетке этот механизм, по-видимому, не играет значительной роли [4]. В то же время показано, что CDK8/19 играют важную роль в экспрессии определенных генов, особенно активации экспрессии ранее инактивированных генов [5–7], а также ключевых онкогенов, например с-Мус [8, 9] и генов Wnt/ $\beta$ -катенинового пути [10]. В некоторых случаях обнаружена корреляция уровня экспрессии с присутствием CDK8/19 в энхансерах и супер-энхансерах соответствующих генов [11]. Однако, несмотря на важную фундаментальную роль CDK8/19, а также их потенциал как терапевтических мишеней, конкретный молекулярный механизм, обуславливающий зависимость уровня экспрессии определенных генов от CDK8/19, остается неизвестным.

В последнее время появляются работы, в которых сравниваются эффекты химического ингибирования и генетической инактивации и показано, что в определенных моделях генетическая инактивация имеет намного более выраженные эффекты [7, 12, 13]. Из этого должно следовать существование у CDK8/19 киназа-независимых механизмов действия. Подобное сравнение, однако, не всегда точно даже *in vitro* ввиду ограниченной селективности и эффективности ингибиторов, и практически невозможно *in vivo* ввиду особенностей биораспределения и метаболизма химических ингибиторов, а также сложностей с проникновением веществ через гематоэнцефалический и гематотестикулярный барьеры.

Цель данной работы — получение трансгенных мышей с возможностью тканеспецифичной индуцируемой экспрессии мутантой киназонегативной формы CDK8(D173A) для последующего выявления возможных киназа-независимых механизмов действия CDK8/19.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Конструкция

Для проведения трансгенеза использовали вектор pKB2, отличающийся от использованного ранее вектора pKB1 [14, 15] отсутствием репортерного гена. Открытую рамку

Таблица 2. Результаты работ по получению первичных трансгенных животных

Использовано реципиентов	Пересажено клеток	Число родивших мышей	Число родившихся мышат	Число родившихся трансгенных особей
41	487	7	14	6

считывания амплифицировали с помощью полимеразы KapaHiFi (Kapa Biosystems; США) и праймеров P1 и P2 (здесь и далее все олигонуклеотиды, последовательности которых приведены в табл. 1, синтезированы компанией «Евроген», Россия) с кДНК. кДНК получали путем обратной транскрипции с использованием ревертазы RevertAid (Thermo Scientific; США) на основе РНК, выделенной из головного мозга мыши с помощью ExtractRNA («Евроген»; Россия). При амплификации к открытой рамке считывания были добавлены рестриктивные сайты AgeI на 5'-конце и MluI на 3'-конце для последующего переноса в финальный вектор, а также консенсусная последовательность Козак. Амплифицированную рамку считывания клонировали в вектор CloneJet (Thermo Scientific; США) и отсекали. Мутацию с.A518C внесли методом сайт-направленного мутагенеза в процессе полимеразной цепной реакции с предварительно фосфорилированными праймерами P3 и P4. Наличие целевой мутации и отсутствие дополнительных были подтверждены с помощью секвенирования. Затем OPC полученного варианта гена mCdk8kd (kinase-dead) переклонировали по сайтам AgeI и MluI (все эндонуклеазы рестрикции производства Thermo Scientific, США) в вектор pKB2. Конструкцию линеаризовали по сайтам SalI и NotI, разделили на электрофореze, выделили из геля набором Cleanup Mini («Евроген»; Россия), дополнительно очистили на спин-колонке с нейлоновым фильтром 0,22 мкм Corning Costar Spin-X (Corning; США) и развели в буфере для микроинъекций (10 mM Трис, 1 mM ЭДТА) до концентрации ДНК 2 нг/мкл.

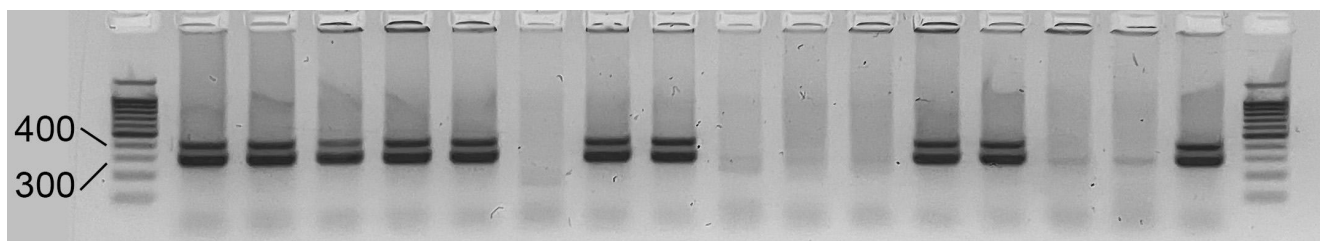
### Содержание мышей

Эмбрионы получали от 30 неполовозрелых (12–13 г веса) самок (F1 гибриды CBA × C57BL/6) и аналогичных самцов возрастом 6–8 недель (питомник «Столбовая»; Россия). В качестве реципиентов и кормилиц использовали аутбредных мышей CD1 (питомник «Столбовая»; Россия). Мышей содержали в виварии ЦКП ИБГ РАН в условиях постоянного доступа к воде и корму. Температуру воздуха поддерживали в диапазоне 22–24 °C, световой цикл (день/ночь) — 14/10 ч.

### Микроинъекции, пересадка эмбрионов

Микроинъекции и пересадку эмбрионов производили как описано ранее [16]. На 19-й день после пересадки эмбрионов реципиентам проводили операцию кесарева





**Рис. 1.** Гель-электрофорез генотипирования мышей поколения  $F_1$ . Дорожки с полосами продуктов ПЦР длины около 300 п.н. (фрагмент стоп-кассеты) и около 400 п.н. (фрагмент терминатора) соответствуют трансгенным мышам. Дорожки с отсутствием полос — мышам дикого типа. Первая и последняя дорожки содержат маркер длин

сечения, а новорожденных мышат подсаживали кормилицам.

### Генотипирование, измерение копийности

Генотипирование животных производили по протоколу, использованному нами ранее [14]. У трансгенных животных методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) одновременно детектировали наличие STOP-кассеты (праймеры P5 и P6) и терминатора (праймеры P7 и P8), входящих в состав вектора rKB2. Копийность встраивания конструкции определяли путем сравнения с генами с известной различной копийностью (HPRT, HbA, H3C7) по результатам ПЦР в реальном времени [14].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

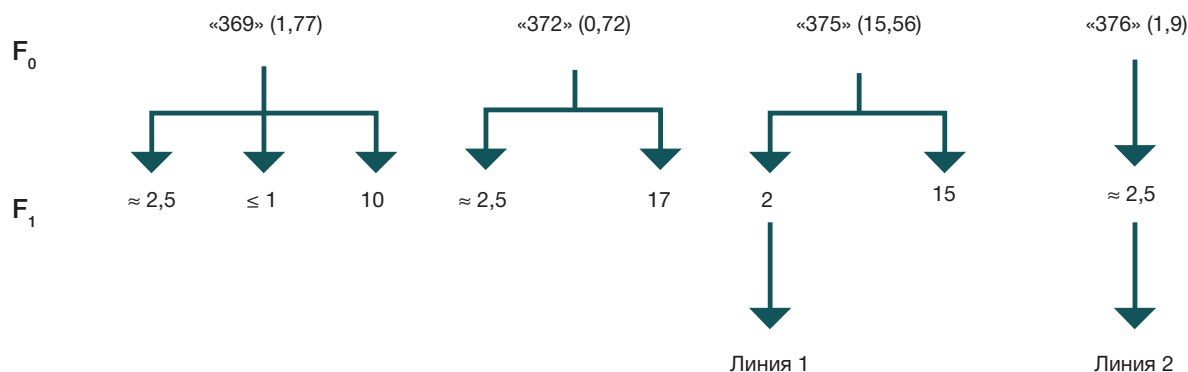
Для получения трансгенных мышей с возможностью индуцируемой и тканеспецифичной экспрессии киназоногетивного варианта CDK8 нами была создана на основе вектора rKB2 генетическая конструкция, содержащая открытую рамку считывания гена *mCdk8* с заменой с.А518С в ДНК (соответственно в белке — D173A) [17]. Помимо инсультатора и терминаторов, предназначенных для защиты от эффекта положения при встраивании, использованный вектор содержит CAG-промотор и STOP-кассету, фланкированную LoxP-сайтами, разделяющую промотор и ОРС. Встроенная таким образом STOP-кассета значительно снижает уровень транскрипции трансгена и делает невозможным дальнейшую трансляцию транскрипта [14].

Линеаризованная конструкция была микроинъектирована в зиготы, из которых 487 выжило и было пересажено реципиентам. В результате родилось 14 мышат, шесть из которых оказались трансгенными. Наличие трансгена подтверждалось у всех рожденных животных ПЦР (рис. 1). Численное описание результатов работ по получению трансгенных животных представлено в табл. 2.

Из шести первичных трансгенных животных два умерли, не достигнув половозрелости, а четыре дали потомство в результате скрещивания с мышами линии C57BL/6J. В настоящий момент получено четыре независимых сублинии: 369, 372, 375, 376. При случайном встраивании в геном возможно образование и последующее включение в хромосомы мультимеров конструкции, а от количества мономеров, в свою очередь, может зависеть уровень экспрессии. Более того, поскольку встраивание может происходить независимо в отдельных blastomeres, животные  $F_0$  могут быть мозаичными, неся различное число копий конструкции в разных клетках. Мы определили среднюю копийность встраивания для  $F_0$  и копийность для полученных сублиний (рис. 2). Полученные значения могут быть нецелочисленными ввиду использования экспоненциальной аппроксимации при определении копийности и усреднении их между клетками, однако в действительности это связано с погрешностью измерений и, начиная с поколения  $F_1$ , копийность принимает постоянные целые значения. Для дальнейшего размножения на уровне  $F_1$  были выбраны две сублинии с копийностью, приблизительно равной 2, что соответствует копийности большинства генов в геноме с диплоидным набором хромосом.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами получена линия мышей, способная к индуцируемой и тканеспецифичной экспрессии киназоногетивной формы mCDK8: шесть животных  $F_0$ , четыре из которых ослили потомство, а два к настоящему моменту стали основателями сублиний. Эффективность получения трансгенов составила при этом 50% (6 из 12), и в полученных животных  $F_1$  обнаружены дальнейшее расщепление по сравнению с  $F_1$ , связанный с мозаичностью  $F_0$ , и большой разброс копийности встраивания конструкции от 1 до 17. Это позволило нам выбрать для дальнейших исследований линии с копийностью, наиболее приближенной к естественной.



**Рис. 2.** Схема полученных сублиний и копийность их представителей. В кавычках даны названия сублиний. В скобках — усредненные копийности родоначальников  $F_0$ . Для  $F_1$  указаны только копийности

Ряд исследований рассматривают последствия генетического нокаута CDK8 и/или CDK19 [18–20], однако используемые в них модели не позволяют сделать окончательный вывод о том, какую роль в наблюдаемых фенотипах играет отсутствие белков CDK8/19 и невозможность сборки киназного модуля комплекса Mediator, а какую прекращение соответствующего фосфорилирования. Более того, применение ингибиторов CDK8/19 у животных привело к эффектам, отличающимся от описанных у нокаутных животных [21]. Полученная нами линия животных — подходящий инструмент для разделения киназа-зависимых и киназа-независимых функций CDK8/19.

## ВЫВОДЫ

В исследовании были получены трансгенные мыши, предоставляющие возможность тканеспецифичной и индуцируемой экспрессии киназонегативной формы циклин-зависимой киназы CDK8. Впоследствии, после скрещивания с мышами CDK19<sup>-/-</sup>, CDK8<sup>fl/fl</sup>, а также различными активаторами, будут получены животные, в которых CDK8 и CDK19 дикого типа можно будет убиквитарно или тканеспецифично заменить на киназонегативный вариант. В экспериментах с такими животными могут быть обнаружены киназа-независимые механизмы действия CDK8/19.

## Литература

1. Dannappel MV, Sooraj D, Loh JJ, Firestein R. Molecular and in vivo Functions of the CDK8 and CDK19 Kinase Modules. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019; 6. DOI: 10.3389/fcell.2018.00171.
2. Li N, Fassi A, Chick J, Inuzuka H, Li X, Mansour MR, et al. Cyclin C is a haploinsufficient tumour suppressor. *Nature cell biology*. 2014; 16 (11): 1080–91. Epub 2014/10/27. DOI: 10.1038/ncb3046. PubMed PMID: 25344755; PubMed Central PMCID: PMC4235773.
3. Bancerek J, Poss ZC, Steinparzer I, Sedlyarov V, Pfaffenwimmer T, Mikulic I, et al. CDK8 kinase phosphorylates transcription factor STAT1 to selectively regulate the interferon response. *Immunity*. 2013; 38 (2): 250–62. Epub 2013/01/29. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.10.017. PubMed PMID: 23352233; PubMed Central PMCID: PMC3580287.
4. Galbraith MD, Donner AJ, Espinosa JM. CDK8: a positive regulator of transcription. *Transcription*. 2010; 1 (1): 4–12. Epub 2011/02/18. DOI: 10.4161/trns.1.1.12373. PubMed PMID: 21327159; PubMed Central PMCID: PMC3035184.
5. Chen M, Liang J, Ji H, Yang Z, Altilla S, Hu B, et al. CDK8/19 Mediator kinases potentiate induction of transcription by NFκB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017; 114 (38): 10208–13. DOI: 10.1073/pnas.1710467114.
6. Galbraith Matthew D, Allen Mary A, Bensard Claire L, Wang X, Schwinn Marie K, Qin B, et al. HIF1A Employs CDK8-Mediator to Stimulate RNAPII Elongation in Response to Hypoxia. *Cell*. 2013; 153 (6): 1327–39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.048>.
7. Steinparzer I, Sedlyarov V, Rubin JD, Eislmayr K, Galbraith MD, Levandowski CB, et al. Transcriptional Responses to IFN-γ Require Mediator Kinase-Dependent Pause Release and Mechanistically Distinct CDK8 and CDK19 Functions. *Molecular Cell*. 2019; 76 (3): 485–99. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.034>.
8. Adler AS, McClelland ML, Truong T, Lau S, Modrusan Z, Soukup TM, et al. CDK8 Maintains Tumor Dedifferentiation and Embryonic Stem Cell Pluripotency. *Cancer Research*. 2012; 72 (8): 2129–39. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3886.
9. Fukasawa K, Kadota T, Horie T, Tokumura K, Terada R, Kitaguchi Y, et al. CDK8 maintains stemness and tumorigenicity of glioma stem cells by regulating the c-MYC pathway. *Oncogene*. 2021; 40 (15): 2803–15. DOI: 10.1038/s41388-021-01745-1.
10. Firestein R, Bass AJ, Kim SY, Dunn IF, Silver SJ, Guney I, et al. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature*. 2008; 455 (7212): 547–51. Epub 2008/09/17. DOI: 10.1038/nature07179. PubMed PMID: 18794900; PubMed Central PMCID: PMC2587138.
11. Bruter AV, Rodionova MD, Varlamova EA, Shtil AA. Super-Enhancers in the Regulation of Gene Transcription: General Aspects and Antitumor Targets. *Acta naturae*. 2021; 13 (1): 4–15. Epub 2021/05/08. DOI: 10.32607/actanaturae.11067. PubMed PMID: 33959383; PubMed Central PMCID: PMC8084300.
12. Audetat KA, Galbraith Matthew D, Odell Aaron T, Lee T, Pandey A, Espinosa Joaquin M, et al. A Kinase-Independent Role for Cyclin-Dependent Kinase 19 in p53 Response. *Molecular and Cellular Biology*. 2017; 37 (13): e00626–16. DOI: 10.1128/MCB.00626-16.
13. Menzl I, Zhang T, Berger-Becvar A, Grausenburger R, Heller G, Prchal-Murphy M, et al. A kinase-independent role for CDK8 in BCR-ABL1(+) leukemia. *Nature communications*. 2019; 10 (1): 4741. Epub 2019/10/20. DOI: 10.1038/s41467-019-12656-x. PubMed PMID: 31628323.
14. Bruter AV, Korshunova DS, Kubekina MV, Sergiev PV, Kalinina AA, Ilchuk LA, et al. Novel transgenic mice with Cre-dependent co-expression of GFP and human ACE2: a safe tool for study of COVID-19 pathogenesis. *Transgenic research*. 2021; 30 (3): 289–301. Epub 2021/04/16. DOI: 10.1007/s11248-021-00249-8. PubMed PMID: 33855640; PubMed Central PMCID: PMC8045570.
15. Kubekina MV, Silaeva YY, Bruter AV, Korshunova DS, Ilchuk LA, Okulova YD, et al. Transgenic mice Cre-dependently expressing mutant polymerase-gamma: novel test-system for pharmacological study of mitoprotective drugs. *Research Results in Pharmacology*. 2021; 7 (3): 33–9.
16. Silaeva YY, Kirikovich YK, Skuratovskaya LN, Deikin AV. Optimal Number of Embryos for Transplantation in Obtaining Genetic-Modified Mice and Goats. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2018; 49 (6): 356–61. DOI: 10.1134/S106236041806005X.
17. Akoulitchchev S, Chuikov S, Reinberg D. TFIIF is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature*. 2000; 407 (6800): 102–6. DOI: 10.1038/35024111. PMID: 10993082.
18. McClelland ML, Soukup TM, Liu SD, Esensten JH, de Sousa e Melo F, Yaylaoglu M, et al. Cdk8 deletion in the Apc(Min) murine tumour model represses EZH2 activity and accelerates tumorigenesis. *The Journal of pathology*. 2015; 237 (4): 508–19. Epub 2015/08/04. DOI: 10.1002/path.4596. PubMed PMID: 26235356.
19. Dannappel MV, Zhu D, Sun X, Chua HK, Poppelaars M, Suehiro M, et al. CDK8 and CDK19 regulate intestinal differentiation and homeostasis via the chromatin remodeling complex SWI/SNF. *The Journal of clinical investigation*. 2022; 132 (20). Epub 2022/08/26. DOI: 10.1172/jci158593. PubMed PMID: 36006697; PubMed Central PMCID: PMC9566890.
20. Prieto S, Dubra G, Camasses A, Aznar AB, Begon-Pescia C, Simboeck E, et al. CDK8 and CDK19 act redundantly to control the CFTR pathway in the intestinal epithelium. *EMBO reports*. n/a (n/a): e54261. DOI: <https://doi.org/10.15252/embr.202154261>.
21. Clarke PA, Ortiz-Ruiz MJ, TePoele R, Adeniji-Popoola O, Box G, Court W, et al. Assessing the mechanism and therapeutic potential of modulators of the human Mediator complex-associated protein kinases. *eLife*. 2016; 5. Epub 2016/12/10. DOI: 10.7554/eLife.20722. PubMed PMID: 27935476; PubMed Central PMCID: PMC5224920.

## References

1. Dannappel MV, Sooraj D, Loh JJ, Firestein R. Molecular and in vivo Functions of the CDK8 and CDK19 Kinase Modules. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019; 6. DOI: 10.3389/fcell.2018.00171.
2. Li N, Fassl A, Chick J, Inuzuka H, Li X, Mansour MR, et al. Cyclin C is a haploinsufficient tumour suppressor. *Nature cell biology*. 2014; 16 (11): 1080–91. Epub 2014/10/27. DOI: 10.1038/ncb3046. PubMed PMID: 25344755; PubMed Central PMCID: PMC4235773.
3. Bancerek J, Poss ZC, Steinparzer I, Sedlyarov V, Pfaffenwimmer T, Mikulic I, et al. CDK8 kinase phosphorylates transcription factor STAT1 to selectively regulate the interferon response. *Immunity*. 2013; 38 (2): 250–62. Epub 2013/01/29. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.10.017. PubMed PMID: 23352233; PubMed Central PMCID: PMC3580287.
4. Galbraith MD, Donner AJ, Espinosa JM. CDK8: a positive regulator of transcription. *Transcription*. 2010; 1 (1): 4–12. Epub 2011/02/18. DOI: 10.4161/trns.1.1.12373. PubMed PMID: 21327159; PubMed Central PMCID: PMC3035184.
5. Chen M, Liang J, Ji H, Yang Z, Altia S, Hu B, et al. CDK8/19 Mediator kinases potentiate induction of transcription by NFκB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017; 114 (38): 10208–13. DOI: 10.1073/pnas.1710467114.
6. Galbraith Matthew D, Allen Mary A, Bensard Claire L, Wang X, Schwinn Marie K, Qin B, et al. HIF1A Employs CDK8-Mediator to Stimulate RNAPII Elongation in Response to Hypoxia. *Cell*. 2013; 153 (6): 1327–39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.048>.
7. Steinparzer I, Sedlyarov V, Rubin JD, Eismayr K, Galbraith MD, Levandowski CB, et al. Transcriptional Responses to IFN-γ Require Mediator Kinase-Dependent Pause Release and Mechanistically Distinct CDK8 and CDK19 Functions. *Molecular Cell*. 2019; 76 (3): 485–99. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.034>.
8. Adler AS, McClelland ML, Truong T, Lau S, Modrusan Z, Soukup TM, et al. CDK8 Maintains Tumor Dedifferentiation and Embryonic Stem Cell Pluripotency. *Cancer Research*. 2012; 72 (8): 2129–39. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3886.
9. Fukasawa K, Kadota T, Horie T, Tokumura K, Terada R, Kitaguchi Y, et al. CDK8 maintains stemness and tumorigenicity of glioma stem cells by regulating the c-MYC pathway. *Oncogene*. 2021; 40 (15): 2803–15. DOI: 10.1038/s41388-021-01745-1.
10. Firestein R, Bass AJ, Kim SY, Dunn IF, Silver SJ, Guney I, et al. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature*. 2008; 455 (7212): 547–51. Epub 2008/09/17. DOI: 10.1038/nature07179. PubMed PMID: 18794900; PubMed Central PMCID: PMC2587138.
11. Bruter AV, Rodionova MD, Varlamova EA, Shtil AA. Super-Enhancers in the Regulation of Gene Transcription: General Aspects and Antitumor Targets. *Acta naturae*. 2021; 13 (1): 4–15. Epub 2021/05/08. DOI: 10.32607/actanaturae.11067. PubMed PMID: 33959383; PubMed Central PMCID: PMC8084300.
12. Audetat KA, Galbraith Matthew D, Odell Aaron T, Lee T, Pandey A, Espinosa Joaquin M, et al. A Kinase-Independent Role for Cyclin-Dependent Kinase 19 in p53 Response. *Molecular and Cellular Biology*. 2017; 37 (13): e00626–16. DOI: 10.1128/MCB.00626-16.
13. Menzl I, Zhang T, Berger-Becvar A, Grausenburger R, Heller G, Prchal-Murphy M, et al. A kinase-independent role for CDK8 in BCR-ABL1(+) leukemia. *Nature communications*. 2019; 10 (1): 4741. Epub 2019/10/20. DOI: 10.1038/s41467-019-12656-x. PubMed PMID: 31628323.
14. Bruter AV, Korshunova DS, Kubekina MV, Sergiev PV, Kalina AA, Ilchuk LA, et al. Novel transgenic mice with Cre-dependent co-expression of GFP and human ACE2: a safe tool for study of COVID-19 pathogenesis. *Transgenic research*. 2021; 30 (3): 289–301. Epub 2021/04/16. DOI: 10.1007/s11248-021-00249-8. PubMed PMID: 33855640; PubMed Central PMCID: PMC8045570.
15. Kubekina MV, Silaeva YY, Bruter AV, Korshunova DS, Ilchuk LA, Okulova YD, et al. Transgenic mice Cre-dependently expressing mutant polymerase-gamma: novel test-system for pharmacological study of mitoprotective drugs. *Research Results in Pharmacology*. 2021; 7 (3): 33–9.
16. Silaeva YY, Kirikovich YK, Skuratovskaya LN, Deikin AV. Optimal Number of Embryos for Transplantation in Obtaining Genetic-Modified Mice and Goats. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2018; 49 (6): 356–61. DOI: 10.1134/S106236041806005X.
17. Akoulitchev S, Chuikov S, Reinberg D. TFIIH is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature*. 2000; 407 (6800): 102–6. DOI: 10.1038/35024111. PMID: 10993082.
18. McClelland ML, Soukup TM, Liu SD, Esensten JH, de Sousa e Melo F, Yaylaoglu M, et al. Cdk8 deletion in the Apc(Min) murine tumour model represses EZH2 activity and accelerates tumorigenesis. *The Journal of pathology*. 2015; 237 (4): 508–19. Epub 2015/08/04. DOI: 10.1002/path.4596. PubMed PMID: 26235356.
19. Dannappel MV, Zhu D, Sun X, Chua HK, Poppelaars M, Suehiro M, et al. CDK8 and CDK19 regulate intestinal differentiation and homeostasis via the chromatin remodeling complex SWI/SNF. *The Journal of clinical investigation*. 2022; 132 (20). Epub 2022/08/26. DOI: 10.1172/jci158593. PubMed PMID: 36006697; PubMed Central PMCID: PMC9566890.
20. Prieto S, Dubra G, Camasses A, Aznar AB, Begon-Pescia C, Simboeck E, et al. CDK8 and CDK19 act redundantly to control the CFTR pathway in the intestinal epithelium. *EMBO reports*. n/a (n/a): e54261. DOI: <https://doi.org/10.15252/embr.202154261>.
21. Clarke PA, Ortiz-Ruiz MJ, TePoele R, Adeniji-Popoola O, Box G, Court W, et al. Assessing the mechanism and therapeutic potential of modulators of the human Mediator complex-associated protein kinases. *eLife*. 2016; 5. Epub 2016/12/10. DOI: 10.7554/eLife.20722. PubMed PMID: 27935476; PubMed Central PMCID: PMC5224920.

НОКАУТ МУТАНТНОГО *TP53* В КЛЕТКАХ ЛИНИИ НАСАТ УСИЛИВАЕТ ИХ МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬП. М. Кожин<sup>1</sup>, Д. Д. Ромашин<sup>1</sup>, А. Л. Русанов<sup>1</sup>✉, Н. Г. Лузгина<sup>1</sup><sup>1</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва, Россия

Линия HaCaT — спонтанно immortalized неканцерогенные кератиноциты человека, широко используемые в качестве модели для изучения функций нормальных кератиноцитов человека. В геноме клеток HaCaT присутствуют две аллели гена *TP53*, которые содержат две gain-of-function (GOF) мутации, приобретенные в результате спонтанной immortalization (*mutTP53*). Наличие мутаций приводит к увеличению скорости пролиферации и нарушению программы стратификации. Целью исследования было изучить влияние нокаута гена *mutTP53* на способность кератиноцитов линии HaCaT к пролиферации и миграции в модели повреждения и регенерации эпидермиса *in vitro* (скретч-тест), а также на способность формировать многослойный эпителий в органотипической модели эпидермиса. Для проведения скретч-теста клетки культивировали до образования монослоя, затем наносили стандартизованное повреждение. Органотипическую модель получали культивированием кератиноцитов в поликарбонатных мембранных вставках с диаметром пор 0,4 мкм на границе раздела фаз (воздух-жидкость). Продemonstrировано, что нокаут мутантного гена *TP53* приводит к увеличению миграционной способности кератиноцитов линии HaCaT: для HaCaT с нокаутом *mutTP53* закрытие дефекта происходило быстрее по сравнению с соответствующей группой WT HaCaT ( $p < 0,05$ ), на третьи сутки размер дефекта составлял  $12\% \pm 3\%$  и  $66\% \pm 5\%$  от первоначального. Получены данные, что мутантный *TP53* в клетках HaCaT является негативным регулятором экспрессии ламинина-5 (экспрессия *LAMC2* была выше в клетках с нокаутом *mutTP53* в  $9,96 \pm 1,92$  раз,  $p < 0,05$ ), однако это не способствует нормализации программы дифференцировки и стратификации эпителия с образованием рогового слоя в органотипической модели.

**Ключевые слова:** HaCaT, дифференцировка кератиноцитов, p53, CRISPR/Cas9, нокаут, миграция**Финансирование:** работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800481-0).**Вклад авторов:** Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — концепция исследования; Д. Д. Ромашин, П. М. Кожин, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — дизайн исследования и анализ литературы; Д. Д. Ромашин, П. М. Кожин — планирование и проведение исследования; П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — анализ и интерпретация полученных данных; П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин — подготовка текста статьи; П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — редактирование рукописи.**Соблюдение этических стандартов:** исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и всех ее пересмотров.✉ **Для корреспонденции:** Александр Леонидович Русанов  
ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, г. Москва, 119121, Россия; alexander.l.rusanov@gmail.com**Статья получена:** 09.12.2022 **Статья принята к печати:** 24.12.2022 **Опубликована онлайн:** 30.12.2022**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.070KNOCKOUT OF MUTANT *TP53* IN THE HACAT CELLS ENHANCES THEIR MIGRATION ACTIVITYKozhin PM<sup>1</sup>, Romashin DD<sup>1</sup>, Rusanov AL<sup>1</sup> ✉, Luzgina NG<sup>1</sup><sup>1</sup> Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

The HaCaT cell line represents the spontaneously immortalized non-carcinogenic human keratinocytes that are used as a model for studying the function of normal human keratinocytes. There are two *TP53* alleles in the HaCaT cell genome, which comprise two gain-of-function (GOF) mutations acquired through spontaneous immortalization (*mutTP53*). Mutations result in the increased proliferation rate and violation of the stratification program. The study was aimed to assess the effects of the *mutTP53* gene knockout on the HaCaT keratinocytes capability of proliferation and migration in the *in vitro* model of epidermal injury and regeneration (scratch test), and on the ability to form stratified epithelium in the organotypic epidermal model. To perform the scratch-test, cells were cultured until monolayer was formed, then the standardized wound was created. The organotypic model was obtained by growing keratinocytes in the polycarbonate membrane inserts with the pore size of 0.4 μm at the interface between the phases (air-liquid). It has been shown that the mutant *TP53* gene knockout results in the increased migration capability of the HaCaT keratinocytes: in the *mutTP53* knockout HaCaT, the defect closure occurred faster than in the appropriate group of the WT HaCaT ( $p < 0.05$ ), on day three the defect size was  $12\% \pm 3\%$  and  $66\% \pm 5\%$  of the initial size. There is evidence that mutant *TP53* in the HaCaT cells is a negative regulator of the laminin-5 expression (*LAMC2* expression was  $9.96 \pm 1.92$  times higher in the cells with the *mutTP53* knockout,  $p < 0.05$ ), however, this does not promote normalization of the program of epithelial differentiation and stratification followed by formation of the stratum corneum in the organotypic model.

**Keywords:** HaCaT, keratinocyte differentiation, p53, CRISPR/Cas9, knockout, migration**Funding:** the study was carried out as part of the Program for fundamental research in the Russian Federation for the long-term period (2021–2030) (№ 122022800481-0).**Author contribution:** Luzgina NG, Rusanov AL — study concept; Romashin DD, Kozhin PM, Luzgina NG, Rusanov AL — study design and literature review; Romashin DD, Kozhin PM — study planning and execution; Kozhin PM, Romashin DD, Luzgina NG, Rusanov AL — data analysis and interpretation; Kozhin PM, Romashin DD — manuscript writing; Kozhin PM, Romashin DD, Luzgina NG, Rusanov AL — manuscript editing.**Compliance with ethical standards:** the study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association and all its revisions.✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander L. Rusanov  
Pogodinskaya, 10, str. 8, Moscow, 119121, Russia; alexander.l.rusanov@gmail.com**Received:** 09.12.2022 **Accepted:** 24.12.2022 **Published online:** 30.12.2022**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.070

Линия HaCaT (спонтанно immortalized неканцерогенные кератиноциты человека) получила широкое распространение в качестве модели для изучения функций нормальных кератиноцитов человека [1, 2]. Однако

в кератиноцитах линии HaCaT нарушены программа стратификации и экспрессия маркеров дифференцировки [3]. Известно, что в геноме кератиноцитов HaCaT присутствуют два аллеля гена *TP53* (H179Y и R282Q),



которые содержат две gain-of-function (GOF) мутации, приобретенные в результате спонтанной иммортализации (*mutTP53*) [4]. *mutTP53* в клетках линии HaCaT обладает выраженной активностью в отношении увеличения скорости пролиферации и роста клеток и имеет более 7000 сайтов связывания с ДНК. При этом связанные с запуском апоптоза функции белка сохранены [5]. Известно, что мутантный p53 действует как минимум двумя путями: влияет на функцию p63/p73, ингибируя их связывание с ДНК [6], или сам связывается с новыми сайтами ДНК, взаимодействуя с другими транскрипционными факторами (NF- $\kappa$ B, E2F1, NF-KB, VDR, p63) [7, 8].

Среди базовых физиологических характеристик клеток линии HaCaT наибольший интерес представляют: пролиферация, миграция, стратификация и образование трехмерных органотипических структур.

Ранее нами показано, что изменение активности *mutp53* в клетках HaCaT приводит к изменению экспрессии маркеров дифференцировки (в частности, каспазы 14, инволютина и транслугутиназы-1) и сопровождается изменением экспрессии p63 [9].

Понимание особенностей физиологии клеток HaCaT и лежащих в их основе молекулярных механизмов необходимо для оценки ограничений при использовании таких клеток в качестве модельных. Кроме того, изучение клеток с *mutTP53* позволяет получить новые данные для исследования канцерогенеза [10, 11].

Целью исследования было изучить особенности изменения миграционной способности клеток HaCaT при нокауте гена *mutTP53*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Клеточные линии и условия культивирования

Клеточная линия HaCaT была приобретена в коллекции клеточных культур German Cancer Research Center (DKFZ, Heidelberg; Германия). Клеточная культура кератиноцитов HaCaT с нокаутом *mutTP53* (dp53) была получена ранее [13]. Клетки культивировали при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM/F12 (1:1; Gibco; США) с добавлением 1% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific; США), раствора пенициллина/стрептомицина в объеме 100 ед./мл и 100 мкг/мл соответственно (Gibco; США) и 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Диа-М»; Россия).

Клеточная культура нормальных кератиноцитов человека (NHK, пул из пяти доноров) приобретена в ООО НПО «Перспектива» (Новосибирск, Россия). Клетки культивировали при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в среде Keratinocyte SFM (Gibco; США), содержащей 1% GlutaMAX (Gibco; США), 1% антибиотика/антимикотика (Gibco; США), 50 мкг/мл BPE (Gibco; США), 10 нг/мл EGF (Gibco; США).

Клетки выращивали в культуральных флаконах площадью 25 см<sup>2</sup> или в чашках Петри диаметром 60 мм (Corning; США). Среду заменяли на свежую каждый второй день культивирования.

### Анализ клеточного цикла

Клеточный цикл исследовали по включению Edu (Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488; ThermoFisher, США) и количеству ДНК по окраске Propidium Iodide (PI) (Sigma; США). Клетки рассаживали в лунки шестилучного планшета и культивировали до достижения 50% конфлюэнта. Затем к клеткам добавляли Edu и производили окраску

согласно рекомендациям производителя. Инкубировали с раствором РНКазы 100 мкг/мл и PI 1 мкг/мл в течение 30 мин. Детекцию производили с помощью проточного цитофлуориметра ZE5 (Bio-Rad; США) и программного обеспечения Everest 2.4.0.1365 (Bio-Rad; США).

Высоко позитивное окрашивание по Edu характерно для клеток, находящихся в S-фазе. Высоко позитивное окрашивание по PI характерно для клеток с удвоенным количеством ДНК, находящихся в G<sub>2</sub>/M-фазе клеточного цикла.

### Сравнение скорости пролиферации клеток

Сравнения скорости пролиферации клеток линии HaCaT дикого типа (WT) и с нокаутом *mutTP53* (dp53) проводили с помощью CytoTrace Red CMTPX (AAT Bioquest; США). Клетки рассаживали в лунки шестилучного планшета и культивировали до достижения 50% конфлюэнта. Затем клетки окрашивали CellTracer (согласно рекомендациям производителя), культивировали в течение 24 ч. Детекцию производили с помощью проточного цитофлуориметра ZE5 (Bio-Rad; США) и программного обеспечения Everest 2.4.0.1365 (Bio-Rad; США). Уменьшение интенсивности флуоресценции (разбавление метки) отражает количество клеточных делений.

### Scratch-тест: оценка скорости зарастания дефекта монослоя клеток

Для проведения scratch-теста в лунки 24-луночного планшета вносили по 50 тыс. клеток HaCaT дикого типа (WT), с нокаутом *mutTP53* (dp53) или нормальные кератиноциты человека (NHK) и преинкубировали в полной культуральной среде при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> до образования монослоя в лунке. Затем наносили стандартизованное повреждение монослоя с помощью пластмассового скребка, промывали клетки раствором DPBS и культивировали далее в полной культуральной среде в течение трех суток. Каждую лунку фотографировали по всей длине повреждения ежедневно. Обработку фотографий проводили с использованием библиотеки skimage [12]. Вычисляли площадь, не занятую клетками (площадь дефекта), через 0, 24, 48 и 72 ч после нанесения дефекта и находили соотношение по сравнению с начальной площадью дефекта (относительная площадь дефекта). Эксперимент проводили в трех повторах.

### Протеомные данные

Анализ полученных нами ранее протеомных данных [13], депонированных в ProteomeXchange Consortium (адрес доступен <http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=PX0030700>), производили с помощью ПО MaxQuant (v1.6.3.4). Было проанализировано по три биологических повтора для каждой линии (клетки линии HaCaT дикого типа и с нокаутом гена *mutTP53*) в трех технических повторах.

### Определение уровня экспрессии генов

РНК выделяли с помощью набора RNeasy Kit (QIAGEN; США) согласно протоколу производителя. Количество полученной РНК измеряли на приборе NanoDrop 2000c (Thermo Scientific; США). Для проведения реакции обратной транскрипции использовали набор MMLV RT kit («Евроген»; Россия) по стандартному протоколу, добавляя в реакцию

Таблица 1. Используемые праймеры

Ген	Последовательность праймеров
<i>GAPDH</i>	Forward 5'-TCGACAGTCAGCCGATCTTCTTT-3' Reverse 5'-ACCAAATCCGTTGACTCCGACCTT-3'
<i>LAMB3</i>	Forward 5'-TGGCTGAAGATGAGACCATTC-3'; Reverse 5'-GGTAGATGAAGCTCGGAGAAAC-3'
<i>LAMC2</i>	Forward 5'-TGGATGAGTTCAAGCGTACAC-3'; Reverse 5'-CTTTTAGCAAGATTGGCACGG-3'

по 1 мкг РНК. qPCR проводили, используя qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген»; Россия). Для каждого гена и каждого образца реакцию проводили в трех повторях. В качестве референсного гена использовали *GAPDH*. Используемые праймеры представлены в табл. 1.

### Формирование многослойного кожного эквивалента

Для формирования органотипической модели клетки HaCaT дикого типа (WT), с нокаутом *mutTP53* или нормальные кератиноциты человека (NHK) выращивали в поликарбонатных мембранных вставках Millipore PIP01250 с диаметром пор 0,4 мкм в формате 24-луночного планшета. Мембранные вставки помещали в лунки планшета, после чего вносили в апикальный отдел по 700 тыс. клеток линии HaCaT (дикого типа или клеток с нокаутом *mutTP53*) и 700 мкл среды Submerge (EpiLife (Gibco; США), содержащей 1% GlutaMAX (Gibco; США), 1% антибиотика/антимикотика (Gibco; США), 1% HKGS (Gibco; США), 10 нг/мл EGF (Gibco; США) и 1,5 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma; США)) в базолатеральный отдел. Клетки инкубировали в течение 24 ч (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) для прикрепления клеток и активации пролиферации. Спустя 24 ч полностью удаляли среду из апикального отдела и заменяли среду в базолатеральном отделе на 450 мкл среды для культивирования на границе раздела фаз (ALI-medium: Submerge + 10 нг/мл KGF (Gibco; США) и 1 мМ L-аскорбиновой кислоты (Sigma; США)). Клетки культивировали в течение 10 суток, ежедневно заменяя среду на свежую.

### Иммунофлуоресцентное окрашивание

Полученные клеточные модели фиксировали в 4%-м формалине. Подвергали стандартной гистологической обработке: дегидратировали в серии спиртов с возрастающей концентрацией, заключали в парафиновые блоки, срезы изготавливали с помощью микротом.

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки инкубировали с первичными антителами к KRT5 (ab52635;

Abcam, США), CK10 (ab9025; Abcam, США) и вторичными Alexa Fluor 488-конъюгированными (ab150105; Abcam, США) или Texas Red-конъюгированными (ab6793; Abcam, США) антителами. Все препараты подвергали окрашиванию одновременно с использованием единого набора реактивов (разведений антител и буферов).

### Определение величины электрического сопротивления

Для определения величины электрического сопротивления (TEER) моделей кожи, полученных на основе разных клеток, использовали вольтметр EVOM (World Precision Instruments, Inc.; США). Для этого заменяли питательную среду в базальном отсеке на 0,9% NaCl, и в апикальный отсек мембранной вставки добавляли 300 мкл 0,9% NaCl. Затем помещали электроды в апикальный и базолатеральный отсеки мембранной вставки и измеряли уровень сопротивления (TEER) мембранной вставки с культивируемыми клетками (кожного эквивалента).

### Анализ данных

Полученные результаты обрабатывали с помощью языка программирования для статистической обработки данных R [14]. Различия величин анализируемого параметра между группами определяли с помощью *t*-критерия с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественное сравнение. Статистически значимыми различия считали при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде  $M \pm m$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании пула активно пролиферирующих клеток по включению Edu (аналога Brdu) в ДНК было определено, что HaCaT дикого типа пролиферируют активнее, чем клетки с нокаутом *mutTP53*. В S-фазе у клеток дикого типа (HaCaT WT) наблюдалось в среднем  $45,6 \pm 3,2\%$  клеток, в то время как у клеток с нокаутом *mutTP53* (HaCaT dp53)

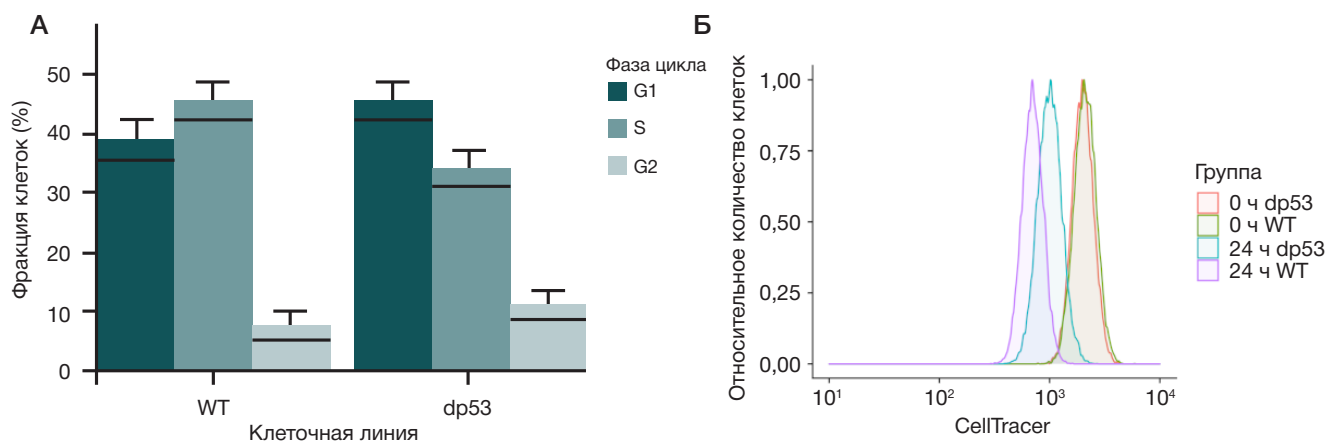
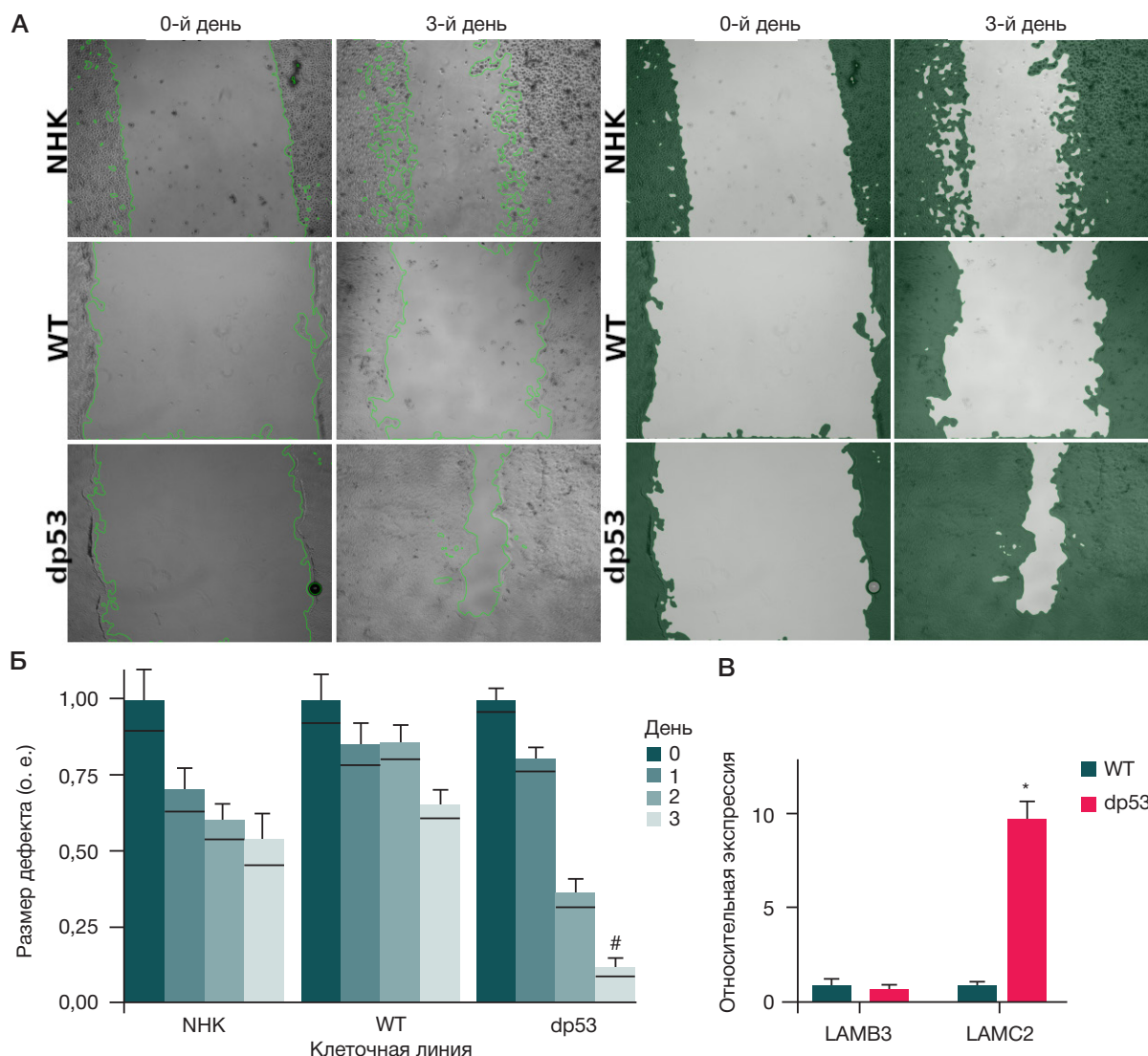


Рис. 1. Пролiferативная активность клеток HaCaT. **А.** Распределение клеток HaCaT дикого типа (WT) и HaCaT с нокаутом *mutTP53* (dp53) по фазам клеточного цикла. **Б.** Пролiferативная активность клеток HaCaT дикого типа (WT) и HaCaT с нокаутом *mutTP53* (dp53)



**Рис. 2.** Scratch-test. Скорость заполнения дефекта монослоя разными типами клеток: нормальные кератиноциты (NHK), клетки HaCaT дикого типа (WT) и HaCaT с нокаутом *mutTP53* (dp53). **А.** Световая микроскопия; ув.  $\times 40$ ; 0-й день (сразу после нанесения) и 3 дня после нанесения дефекта. **Б.** Обобщенная диаграмма относительной площади дефекта на 1-й, 2-й, 3-й день после нанесения дефекта. **В.** Относительная экспрессия генов *LAMB3*, *LAMC2*. \* — значимые различия по сравнению с HaCaT дикого типа ( $p < 0,05$ ); # — значимые различия по сравнению с NHK в соответствующий день ( $p < 0,05$ )

$34,1 \pm 2,9\%$  (рис. 1). Эти данные также подтверждаются результатами разбавления метки CellTracer после 24 ч культивирования.

В Scratch-тесте закрытие дефекта линиями NHK и WT HaCaT происходило практически с одинаковой скоростью. На третьи сутки осталось  $54\% \pm 9\%$  и  $66\% \pm 5\%$  от первоначальной площади дефекта для NHK и WT HaCaT соответственно. В то время как для HaCaT с нокаутом *mutTP53* наблюдалось значительное увеличение скорости закрытия дефекта и на третьи сутки осталось  $12\% \pm 3\%$  ( $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой WT HaCaT) от его первоначальной площади (рис. 2А, Б).

Ранее было проведено сравнительное панорамное протеомное исследование клеток HaCaT дикого типа и с нокаутом гена *mutTP53* [13]. При анализе данных было идентифицировано 2080 белков по двум или более пептидам (исключены потенциальные контаминанты, белки, идентифицированные по одному сайту, ложноположительные определения). Из идентифицированных белков 27 имели достоверно различную экспрессию между анализируемыми линиями ( $FDR < 0,05$ ). Наибольший интерес представляет изменение экспрессии белков *LAMC2*, *LAMB3*: она была значительно

выше в клетках с нокаутом *mutTP53* (в 4,95 и 4,58 раз соответственно).

Данные протеомного исследования в отношении *LAMC2* подтверждают результаты ПЦР-РВ (рис. 2): экспрессия *LAMC2* была значительно выше в клетках с нокаутом *mutp53* ( $9,96 \pm 1,92$ ,  $p < 0,05$ ). В то время как достоверных различий в экспрессии гена *LAMB3* в анализируемых линиях не зафиксировано.

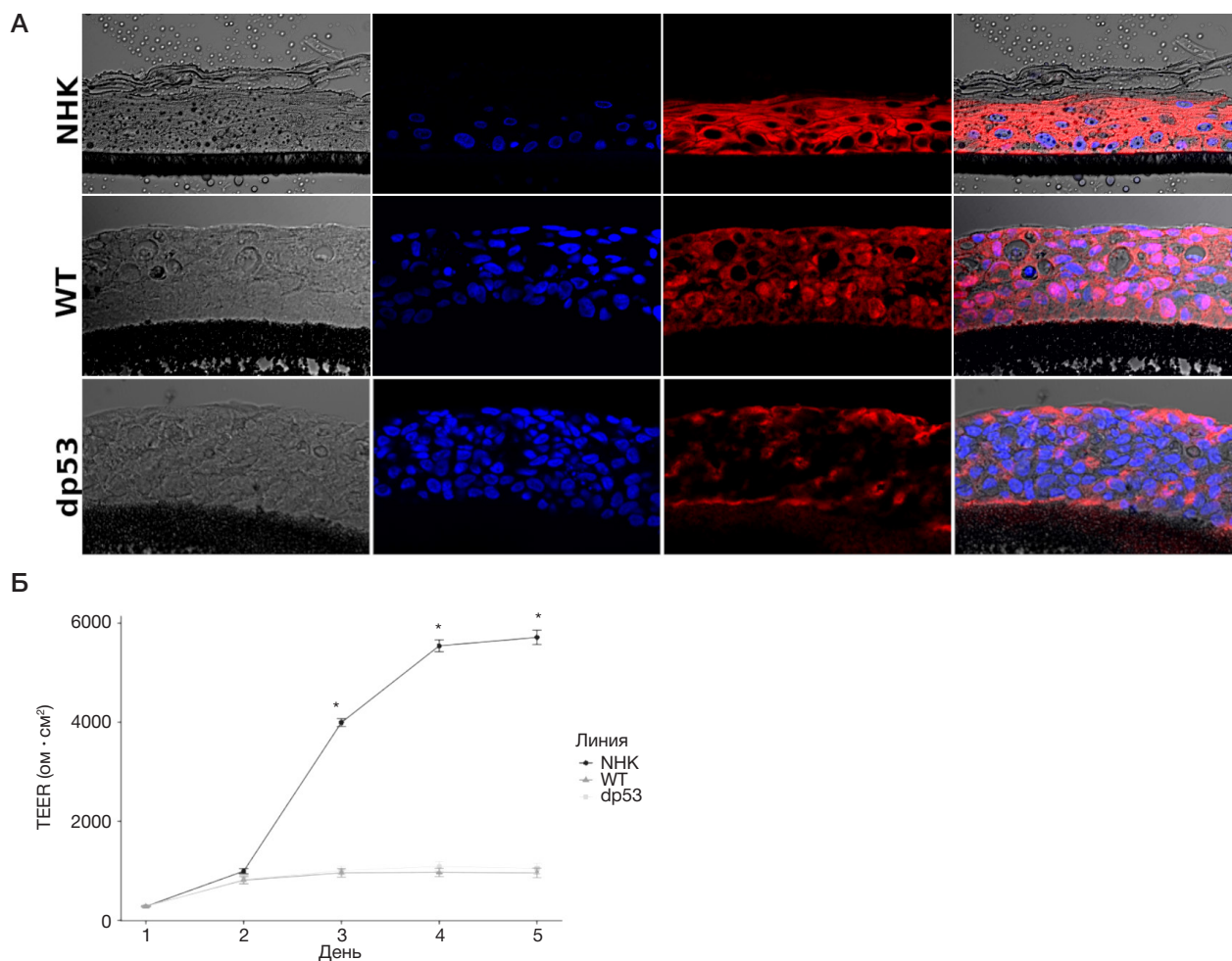
При культивировании 3D-культур все три линии образовывали многослойный кожный эквивалент (рис. 3А). Однако стратификация, типичная для клеток нормального эпидермиса человека, и образование рогового слоя выявлены только для нормальных кератиноцитов (NHK).

В органотипической модели эпидермиса из нормальных кератиноцитов человека (NHK) присутствовал хорошо выраженный роговой слой.

В органотипической модели эпидермиса из кератиноцитов HaCaT дикого типа (WT) и HaCaT с нокаутом *mutTP53* четкой стратификации клеток и образования рогового слоя не наблюдалось. Экспрессию KRT5 наблюдали во всех слоях, она была сопоставимой (рис. 3А).

При измерении трансэпителиального электрического сопротивления в органотипической модели эпидермиса из





**Рис. 3.** Формирование многослойного кожного эквивалента кератиноцитами разных линий: нормальные кератиноциты (NHK), клетки HaCaT дикого типа (WT) и HaCaT с нокаутом гена *mutTP53* (dp53). **А.** Иммунофлуоресцентная микроскопия. Окраска: ядра (DAPI) — синий, KRT5 — красный; ув  $\times 400$ . **Б.** Значения трансэпителиального сопротивления (TEER). \* — значимые различия по сравнению с WT в соответствующий день ( $p < 0,005$ )

нормальных кератиноцитов наблюдалось его возрастание на протяжении всего периода наблюдения.

Органотипические модели эпидермиса из разных типов клеток различались как по максимальным значениям трансэпителиального сопротивления, так и по его динамике в течение пяти дней (рис. 3Б).

Наибольшее значение трансэпителиального сопротивления (TEER) обнаружено у моделей эпидермиса из нормальных кератиноцитов (NHK) —  $5712 \pm 146 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$ . У моделей из кератиноцитов линии HaCaT дикого типа и с нокаутом *mutTP53* значение TEER было ниже почти в 5 раз:  $964 \pm 82$  и  $1088 \pm 91$  соответственно ( $p < 0,05$  по сравнению с клетками NHK).

Быстрее всего трансэпителиальное сопротивление возрастало в органотипической модели эпидермиса из нормальных кератиноцитов человека со второго по четвертый день, с дальнейшим выходом на плато. Величина данного показателя в моделях эпидермиса из кератиноцитов линии HaCaT дикого типа или с нокаутом *mutTP53*, по сравнению с моделью из NHK, имело меньшее значение и выходило на плато уже на вторые сутки.

Увеличение трансэпителиального потенциала связывают с образованием межклеточных контактов и стратификацией эпителия с образованием рогового слоя [15], который наблюдался в модели эпидермиса из нормальных кератиноцитов и отсутствовал в моделях из кератиноцитов HaCaT вне зависимости от наличия нокаута *mutTP53* (рис. 3А).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что мутантная форма p53 в клетках HaCaT ассоциирована с повышенной скоростью роста и пролиферации клеток, что было подтверждено экспериментально более ранними исследованиями [5], а также неспособностью клеток к нормальной дифференцировке с образованием полноценного рогового слоя.

Согласно данным сравнительного протеомного исследования первичных кератиноцитов человека и кератиноцитов линии HaCaT, одним из наиболее заметных отличий клеток является значительно сниженная в клетках HaCaT экспрессия субъединиц комплекса ламинина-5: цепей  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  и  $\gamma 2$  (LAMA3, LAMB3, LAMC2) [16]. Обсуждая полученные результаты, авторы указанной работы сделали предположение, что эта особенность определяет дефектность программы дифференцировки клеток HaCaT.

Ламинины представляют собой основной компонент внеклеточного матрикса и играют важную роль в клеточной адгезии, дифференцировке, передаче сигнала [17]. Комплекс ламинин-5 необходим для стабилизации контактов между эпидермисом и дермой за счет связывания с интегринами  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  и коллагеном VII типа. Также ламинин-5 играет важную роль при миграции клеток. Показано, что снижение экспрессии гена ламинина-5 в кератиноцитах приводит к снижению



их адгезии и нарушению регенерации эпидермиса [18]. Однако повышение экспрессии субъединиц LAMB3 и LAMC2 часто отмечают при онкологических процессах. В результате, опухолевые клетки характеризуются более высокой скоростью миграции и инвазивностью [19].

Согласно полученным нами данным, нокаут гена *mutTP53* в клетках HaCaT действительно приводил к увеличению экспрессии LAMB3 и LAMC2 (данные протеомного исследования клеток). Стоит, однако, отметить, что скорость восстановления дефекта в скрэтч-тесте у нормальных кератиноцитов и клеток HaCaT дикого типа на третий день после повреждения не имела достоверных различий, в то время как у клеток с нокаутированным *mutTP53* данный показатель был значительно выше. Высокую скорость заполнения дефекта в скрэтч-тесте клетками HaCaT с нокаутом *mutTP53* следует связывать именно с их повышенной миграционной активностью, а не с интенсивностью пролиферации, которая в данных клетках была существенно ниже, чем в клетках HaCaT дикого типа.

По-видимому, наличие мутаций в гене *TP53* не влияет значительно на его способность регулировать процессы миграции, в то время как при его инактивации (нокауте), миграционная способность клеток значительно возрастает, в том числе, в сравнении с нормальными кератиноцитами человека, в результате чего клетки HaCaT

с нокаутированным *mutTP53* приобретают черты клеток с «проканцерогенным фенотипом».

Отметим также, что увеличение экспрессии ламинина-5 в результате нокаута гена *mutTP53* никак не сказалось на способности кератиноцитов линии HaCaT образовывать полноценный стратифицированный эпителий в органотипической модели эпидермиса. Это выражалось в отсутствии сформированного рогового слоя и низком уровне трансэпителиального сопротивления (TEER), сопоставимыми с таковыми у клеток дикого типа.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают регулируемую роль мутантного p53 в клетках HaCaT в отношении экспрессии ламинина 5, но не позволяют связать низкий уровень его экспрессии с нарушением программы дифференцировки данных клеток.

## ВЫВОДЫ

Мутантный *TP53* в клетках HaCaT является негативным регулятором экспрессии ламинина 5. Нокаут гена *mutTP53* приводит к увеличению миграционной активности клеток HaCaT, но не способствует нормализации программы дифференцировки. Полученные данные дополняют сведения о функциональных особенностях мутантного *TP53* в клетках HaCaT.

## Литература

- Petushkova NA, Rusanov AL, Pyatnitskiy MA, et al. Proteomic characterization of HaCaT keratinocytes provides new insights into changes associated with SDS exposure. *Biomed Dermatol.* 2020; 4 (1): 4. DOI: 10.1186/s41702-019-0054-y.
- Rusanov AL, Nakhod KV, Nakhod VI, Poverennaya EV, Petushkova NA, Luzgina NG. Changes in the Proteome of HaCaT Keratinocytes Induced by Cytotoxic Substance Triton X-100. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 163 (5): 620–22. DOI: 10.1007/s10517-017-3863-2.
- Smits JPH, Niehues H, Rikken G, et al. Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 11838. DOI: 10.1038/s41598-017-12041-y.
- Lehman TA, Modali R, Boukamp P, et al. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis.* 1993; 14 (5): 833–9. DOI: 10.1093/carcin/14.5.833.
- Martynova E, Pozzi S, Basile V, et al. Gain-of-function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p63. *Oncotarget.* 2012; 3 (2): 132–43. DOI: 10.18632/oncotarget.447.
- Xu J, Reumers J, Couceiro JR, et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol.* 2011; 7 (5): 285–95. DOI: 10.1038/nchembio.546.
- Cordani N, Pozzi S, Martynova E, et al. Mutant p53 subverts p63 control over KLF4 expression in keratinocytes. *Oncogene.* 2011; 30 (8): 922–32. DOI: 10.1038/nc.2010.474.
- Neilsen PM, Noll JE, Suetani RJ, et al. Mutant p53 uses p63 as a molecular chaperone to alter gene expression and induce a pro-invasive secretome. *Oncotarget.* 2011; 2 (12): 1203–17. DOI: 10.18632/oncotarget.382.
- Русанов А. Л., Кожин П. М., Ромашин Д. Д., Карагяур М. Н., Лузгина Н. Г. Влияние модуляции активности p53 на взаимодействие членов семейства p53 в процессе дифференцировки кератиноцитов линии HaCaT. *Вестник РГМУ.* 2020; (6): 60–67. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.082.
- Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol.* 2011; 223 (2): 116–26. DOI: 10.1002/path.2784.
- Muller PAJ, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol.* 2011; 192 (2): 209. DOI: 10.1083/jcb.201009059.
- van der Walt S, Schönberger JL, Nunez-Iglesias J, et al. scikit-image: image processing in Python. *PeerJ.* 2014; 2: e453. DOI: 10.7717/peerj.453.
- Rusanov AL, Romashin DD, Kozhin PM, et al. Impact of p53 Knockout on Protein Data Set of HaCaT Cells in Confluent and Subconfluent Conditions. *Data.* 2022; 7 (3). DOI: 10.3390/data7030027.
- Wickham H, Averick M, Bryan J, et al. Welcome to the Tidyverse. *J Open Source Softw.* 2019; 4: 1686. DOI: 10.21105/joss.01686.
- Rusanov AL, Luzgina ED, Vakhruhev IV, Nakhod KV, Luzgina NG. A Cell Model of Human Small Intestinal Wall Based on Genetically Modified Caco-2 Cells. *Bull Exp Biol Med.* 2018; 166 (1): 174–7. DOI: 10.1007/s10517-018-4308-2.
- Sprenger A, Weber S, Zarai M, et al. Consistency of the proteome in primary human keratinocytes with respect to gender, age, and skin localization. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2013; 12 (9): 2509–21. DOI: 10.1074/mcp.M112.025478.
- Rousselle P, Beck K. Laminin 332 processing impacts cellular behavior. *Cell Adhes Migr.* 2013; 7 (1): 122–34. DOI: 10.4161/cam.23132.
- Natsumi A, Sugawara K, Yasumizu M, et al. Re-investigating the Basement Membrane Zone of Psoriatic Epidermal Lesions: Is Laminin-511 a New Player in Psoriasis Pathogenesis? *J Histochem Cytochem.* 2018; 66 (12): 847–62. DOI: 10.1369/0022155418782693.
- Huang C, Chen J. Laminin-332 mediates proliferation, apoptosis, invasion, migration and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Med Rep.* 2021; 23 (1): 11. DOI: 10.3892/mmr.2020.11649.

## References

- Petushkova NA, Rusanov AL, Pyatnitskiy MA, et al. Proteomic characterization of HaCaT keratinocytes provides new insights into changes associated with SDS exposure. *Biomed Dermatol*. 2020; 4 (1): 4. DOI:10.1186/s41702-019-0054-y.
- Rusanov AL, Nakhod KV, Nakhod VI, Poverennaya EV, Petushkova NA, Luzgina NG. Changes in the Proteome of HaCaT Keratinocytes Induced by Cytotoxic Substance Triton X-100. *Bull Exp Biol Med*. 2017; 163 (5): 620–22. DOI: 10.1007/s10517-017-3863-2.
- Smits JPH, Niehues H, Rikken G, et al. Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): 11838. DOI: 10.1038/s41598-017-12041-y.
- Lehman TA, Modali R, Boukamp P, et al. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*. 1993; 14 (5): 833–9. DOI: 10.1093/carcin/14.5.833.
- Martynova E, Pozzi S, Basile V, et al. Gain-of-function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p63. *Oncotarget*. 2012; 3 (2): 132–43. DOI: 10.18632/oncotarget.447.
- Xu J, Reumers J, Couceiro JR, et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol*. 2011; 7 (5): 285–95. DOI: 10.1038/nchembio.546.
- Cordani N, Pozzi S, Martynova E, et al. Mutant p53 subverts p63 control over KLF4 expression in keratinocytes. *Oncogene*. 2011; 30 (8): 922–32. DOI: 10.1038/nc.2010.474.
- Neilsen PM, Noll JE, Suetani RJ, et al. Mutant p53 uses p63 as a molecular chaperone to alter gene expression and induce a pro-invasive secretome. *Oncotarget*. 2011; 2 (12): 1203–17. DOI: 10.18632/oncotarget.382.
- Rusanov AL, Kozhin PM, Romashin DD, Karagayur MN, Luzgina NG. Impact of p53 modulation on interactions between p53 family members during HaCaT keratinocytes differentiation. *Bulletin of RSMU*. 2020; (6): 58–65. DOI: 10.24075/brsmu.2020.082.
- Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol*. 2011; 223 (2): 116–26. DOI: 10.1002/path.2784.
- Muller PAJ, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol*. 2011; 192 (2): 209. DOI: 10.1083/jcb.201009059.
- van der Walt S, Schönberger JL, Nunez-Iglesias J, et al. scikit-image: image processing in Python. *PeerJ*. 2014; 2: e453. DOI: 10.7717/peerj.453.
- Rusanov AL, Romashin DD, Kozhin PM, et al. Impact of p53 Knockout on Protein Data Set of HaCaT Cells in Confluent and Subconfluent Conditions. *Data*. 2022; 7 (3). DOI: 10.3390/data7030027.
- Wickham H, Averick M, Bryan J, et al. Welcome to the Tidyverse. *J Open Source Softw*. 2019; 4: 1686. DOI: 10.21105/joss.01686.
- Rusanov AL, Luzgina ED, Vakhrushev IV, Nakhod KV, Luzgina NG. A Cell Model of Human Small Intestinal Wall Based on Genetically Modified Caco-2 Cells. *Bull Exp Biol Med*. 2018; 166 (1): 174–7. DOI: 10.1007/s10517-018-4308-2.
- Sprenger A, Weber S, Zarai M, et al. Consistency of the proteome in primary human keratinocytes with respect to gender, age, and skin localization. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2013; 12 (9): 2509–21. DOI: 10.1074/mcp.M112.025478.
- Rousselle P, Beck K. Laminin 332 processing impacts cellular behavior. *Cell Adhes Migr*. 2013; 7 (1): 122–34. DOI: 10.4161/cam.23132.
- Natsumi A, Sugawara K, Yasumizu M, et al. Re-investigating the Basement Membrane Zone of Psoriatic Epidermal Lesions: Is Laminin-511 a New Player in Psoriasis Pathogenesis? *J Histochem Cytochem*. 2018; 66 (12): 847–62. DOI: 10.1369/0022155418782693.
- Huang C, Chen J. Laminin-332 mediates proliferation, apoptosis, invasion, migration and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Med Rep*. 2021; 23 (1): 11. DOI: 10.3892/mmr.2020.11649.

## ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛЯ АМИНОКИСЛОТ В МОНОЦИТАХ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А. В. Новоселова<sup>1✉</sup>, М. Н. Юшина<sup>1</sup>, М. Р. Патышева<sup>2,3</sup>, Е. А. Простакишина<sup>2,3</sup>, О. Д. Брагина<sup>2</sup>, Е. Ю. Гарбуков<sup>2</sup>, Ю. Г. Кзышкowska<sup>3,4,5,6</sup><sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр, Томск, Россия<sup>3</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия<sup>4</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия<sup>5</sup> Институт трансфузионной медицины и иммунологии, Медицинский факультет Маннгейм, Университет Гейдельберга, Гейдельберг, Германия<sup>6</sup> Германский Красный крест Служба крови Баден-Вюртемберг — Гессен, Мангейм, Германия

Моноциты — крупные циркулирующие в крови лейкоциты, которые во взрослом организме являются основными предшественниками тканевых макрофагов, а также опухоли-ассоциированных макрофагов. Различные типы моноцитов имеют разнонаправленное действие в отношении роста и метастатического распространения раковых клеток, как активируют, так и подавляют данные процессы. Опухолевая прогрессия связана с запуском целого каскада воспалительных и иммунных реакций. Данные патологические процессы ассоциированы с изменением содержания аминокислот в составе моноцитов, что может привести к нарушению их функции, в частности миграции, деления и созревания. Целью работы было профилировать аминокислоты моноцитов с последующим изучением особенностей аминокислотного состава моноцитов пациентов с раком молочной железы при помощи жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. Статистически значимые различия уровней метаболитов в моноцитах пациентов с раком молочной железы и моноцитов здоровых доноров обнаружены для глицина ( $p$ -value = 0,0127), аспарагина ( $p$ -value = 0,0197), пролина ( $p$ -value = 0,0159), метионина ( $p$ -value = 0,0357), триптофана ( $p$ -value = 0,0028), тирозина ( $p$ -value = 0,0127). В результате биоинформатического анализа метаболитических путей с участием задействованных аминокислот были определены биологические сети, которые потенциально могут вовлекаться в изменение фенотипа моноцитов под воздействием РМЖ. Разработаны математические модели, построенные на комбинации аминокислот, обладающие 100% чувствительностью и специфичностью. Выявлены особенности метаболизма клеток иммунной системы при РМЖ и предложены потенциальные диагностические биомаркеры.

**Ключевые слова:** моноциты, рак молочной железы, метаболомика, аминокислоты, масс-спектрометрия**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 29 сентября 2021 г. № 075-15-2021-1073 на тему: «Генетическое и эпигенетическое редактирование клеток опухоли и микроокружения с целью блокировки метастазирования»).**Вклад авторов:** А. В. Новоселова — обработка материала, анализ аминокислотного профиля моноцитов, статистическая обработка данных, редактирование текста; М. Н. Юшина — обработка материала, написание и редактирование текста; М. Р. Патышева — концепция и дизайн исследования, выделение моноцитов; Е. А. Простакишина — выделение моноцитов; О. Д. Брагина, Е. Ю. Гарбуков — подбор пациентов, сбор биологического материала, Ю. Г. Кзышкowska — концепция и дизайн исследования.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 10 от 05 декабря 2019 г.), проведено в соответствии со стандартами этического комитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова», федеральными законами Российской Федерации (№ 152, 323 и др.) и Хельсинкской декларацией 1964 г. со всеми последующими дополнениями и изменениями, регламентирующими научные исследования на биоматериалах, полученных от людей. Все участники подписали информированное согласие об участии в исследовании.✉ **Для корреспонденции:** Анастасия Викторовна Новоселова  
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117198, Россия; vfrankevich@gmail.com**Статья получена:** 08.12.2022 **Статья принята к печати:** 22.12.2022 **Опубликована онлайн:** 28.12.2022**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.064

## PECULIARITIES OF AMINO ACID PROFILE IN MONOCYTES IN BREAST CANCER

Novoselova AV<sup>1✉</sup>, Yushina MN<sup>1</sup>, Patysheva MR<sup>2,3</sup>, Protsakishina EA<sup>2,3</sup>, Bragina OD<sup>2</sup>, Garbukov EY<sup>2</sup>, Kzhyshkowska JG<sup>3,4,5,6</sup><sup>1</sup> Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia<sup>2</sup> Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia<sup>3</sup> Tomsk National State University, Tomsk, Russia<sup>4</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia<sup>5</sup> Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Faculty of Medicine Mannheim, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany<sup>6</sup> German Red Cross Blood Service Baden-Württemberg-Hesse, Mannheim, Germany

Monocytes are large circulating white blood cells that are the main precursors of tissue macrophages as well as tumor-associated macrophages in the adult body. Different types of monocytes have multidirectional effects on the growth and metastatic spread of cancer cells, both activating and inhibiting these processes. Tumor progression is associated with the triggering of a whole cascade of inflammatory and immune reactions. These pathological processes are associated with changes in the amino acid content of monocytes, which can lead to disruption of their function, in particular their migration, division and maturation. The aim of the work was to profile the amino acids of monocytes, followed by a study of the amino acid composition of monocytes from patients with breast cancer using liquid chromatography with mass spectrometric detection. Significant differences in metabolite levels in monocytes of breast cancer patients and monocytes of healthy donors were found for glycine ( $p$ -value = 0.0127), asparagine ( $p$ -value = 0.0197), proline ( $p$ -value = 0.0159), methionine ( $p$ -value = 0.0357), tryptophan ( $p$ -value = 0.0028), tyrosine ( $p$ -value = 0.0127). In the study, we identified biological networks that could potentially be involved in altering the phenotype of monocytes affected by breast cancer (BC), using bioinformatic analysis of metabolic pathways involving the discovered amino acids. Mathematical models based on amino acid combinations with 100% sensitivity and specificity have been developed. Features of immune system cell metabolism in BC have been identified and potential diagnostic biomarkers have been proposed.

**Keywords:** monocytes, breast cancer, metabolomics, amino acids, mass spectrometry**Funding:** The study was financially supported by the Russian Federation represented by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement dated 29 September 2021 № 075-15-2021-1073 on the topic "Genetic and epigenetic editing of tumor cells and the microenvironment in order to block metastasis").**Author contribution:** Novoselova AV — material processing, monocyte amino acid profile analysis, statistical data processing, text editing; Yushina MN — material processing, text writing and editing; Patysheva MR — study concept and design, monocyte isolation; Protsakishina EA — monocyte isolation; Bragina OD, Garbukov EY — patient selection, collection of biological material; Kzhyshkowska JG — study concept and design.**Compliance with ethical standards:** the study is approved by the ethics committee of the Research Institute of Oncology under Tomsk National Research Medical Center (record No.10 dated 05 December 2019), was conducted in accordance with the standards of the ethics committee of V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, federal laws of the Russian Federation (Nos. 152, 323, etc.) and the 1964 Declaration of Helsinki with all subsequent additions and amendments regulating scientific research on biomaterials obtained from humans. All participants signed an informed consent to participate in the study.✉ **Correspondence should be addressed:** Anastasia V. Novoselova  
Academik Oparin street, 4, Moscow, 117198, Russia; vfrankevich@gmail.com**Received:** 08.12.2022 **Accepted:** 22.12.2022 **Published online:** 28.12.2022**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.064

Моноциты во взрослом организме являются динамической популяцией основных клеток врожденного иммунитета, которые постоянно формируются из предшественников в костном мозге, и циркулируют в кровотоке от 3 до 6 дней. Моноциты во взрослом организме служат основными предшественниками тканевых макрофагов, основными сенсорами врожденного иммунитета для экзогенных и эндогенных патологических факторов в крови, а также ключевыми предшественниками опухолеассоциированных макрофагов [1–5]. Представляя пул эффекторных клеток врожденного иммунитета с паттернраспознающими рецепторами, они могут выступать в качестве регуляторов опухолевого роста. Различные типы моноцитов имеют разнонаправленное действие в отношении роста и метастатического распространения раковых клеток, они и активируют, и подавляют данные процессы. Опухолевая прогрессия связана с запуском целого каскада воспалительных и иммунных реакций. Данные патологические процессы ассоциированы с изменением содержания аминокислот в составе моноцитов, что может привести к нарушению их функции [6–8].

Моноциты являются предшественниками опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ) и дендритных клеток, которые формируют микроокружение опухоли [9]. В очаге воспаления они выполняют функцию фагоцитоза и выработки провоспалительных цитокинов. В условиях провоспалительного микроокружения они дифференцируются в воспалительные макрофаги и воспалительные дендритные клетки, которые впоследствии мигрируют в лимфатические узлы и активируют Т-лимфоциты CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>. Активированные иммунные клетки в последующем включаются в метаболические пути, ассоциированные с прогрессией раковых клеток [10–13]. Эта общность метаболических процессов создает фундаментальную конкуренцию за питательные субстраты, необходимые как раковым, так и иммунным клеткам в микроокружении опухоли.

Развитие аналитической техники, и в первую очередь жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ЖХ-МС), привело к формированию метаболомики [14–16], которую активно используют для выявления метаболических особенностей онкологических процессов, выяснения механизмов патогенеза и поиска новых лекарственных мишеней [14, 17]. На сегодняшний день особого внимания заслуживает изучение профиля аминокислот. Изменение уровня аминокислот может иметь важное значение для формирования надлежащего иммунного ответа [13, 18–20] и приводить к нарушению миграции, деления и созревания иммунных клеток.

Аминокислоты участвуют в контроле ряда путей, регулирующих реакции иммунных клеток, включая передачу сигналов mTOR и выработку NO [19, 21]. Конкуренция за метаболиты и сигнальное взаимодействие между иммунными клетками хозяина и патогенами могут повлиять на развитие болезни, в том числе и опухолевого процесса [18].

Рак молочной железы (РМЖ) остается лидирующим по распространенности злокачественным новообразованием у женщин [22]. Это первый тип рака, для которого в экспериментах на животных была продемонстрирована роль иммунных клеток в поддержании роста опухоли [23]. Дальнейшие исследования позволили накопить информацию о взаимном влиянии раковых клеток и клеток иммунной системы [7, 9, 17, 24–29].

Изучение гетерогенности моноцитов и их роли на разных стадиях прогрессирования онкологического процесса имеет решающее значение для исследования способности раковых клеток препятствовать иммунологическому надзору и скрываться от агрессии иммунокомпетентных клеток. Работы в этом направлении позволят в будущем выявить новые биомаркеры онкологического процесса и разработать персонализированные пути иммунотерапии рака [30].

Целью работы было установление особенностей аминокислотного профиля моноцитов, выделенных из крови пациенток с РМЖ.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В группу исследования вошли 13 больных в возрасте 36–69 лет с РМЖ IIA–IIIA стадии T1-2N0-1M0. Все пациентки имели Her2<sup>+</sup> молекулярный подтип опухоли (Ki67+ не менее 30%). В контрольную группу вошли 10 здоровых добровольцев в возрасте 50–67 лет. Критерии включения в контрольную группу: отсутствие хронических заболеваний в период обострения, отсутствие онкологических заболеваний в анамнезе, отсутствие аллергических и аутоиммунных заболеваний, подписанное информированное согласие об участии в исследовании.

Объектом исследования послужила периферическая венозная кровь, взятая натощак в пробирки с КЗЭДТА. Из крови получали фракцию мононуклеарных клеток с помощью обогащения на градиенте плотности фиколла (1,077 г/см<sup>3</sup>). Из полученной фракции мононуклеарных клеток выделяли CD14<sup>+</sup>-моноциты по протоколу проведения позитивной магнитной сепарации компании Myltenyi Biotec с использованием магнитного сепаратора MidiMACS (Myltenyi Biotec; Германия). Чистота полученной фракции была определена с помощью проточной

**Таблица 1.** Состав подвижной фазы для ЖХ-МС анализа аминокислот

Время, мин	%A	%B
0	95	5
0,1	95	5
0,2	75	25
5	70	30
15	45	55
20	30	70
20,5	5	95
25	5	95
25,5	95	5
40	95	5



Таблица 2. Параметры транзитных переходов для масс-спектрометрического детектирования аминокислот

Аминокислота	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z	Ускоряющий потенциал ячейки соударений, В	Энергия соударений, В
Метилгистидин	226,2	42,2	122	72
Аминомасляная кислота	160,1	143,1	83	4
5-Гидроксизин	219,2	128	83	12
Аланин	146,1	39,2	83	20
Аргинин	231,18	172,1	83	12
Аспарагин	189,1	144,1	83	8
Аспарагиновая кислота	246,2	144,1	83	8
Цитруллин	232,2	215,1	83	4
Цистин	353,16	130,1	122	20
Глутаминовая кислота	260,19	186,1	83	8
Глютамин	203,1	186,1	83	4
Глицин	132,1	76,2	44	4
Гистидин	212,14	110,1	83	12
Лейцин	188,17	30,3	83	20
Лизин	203,2	186,2	83	4
Метионин	206,1	104,1	83	8
Орнитин	189,2	172,2	83	8
Фенилаланин	222,1	103,1	83	40
Пролин	172,1	116,1	83	12
Саркозин	146,1	44,3	83	12
Серин	162,12	106,1	83	8
Треонин	176,13	158,1	83	4
Транс-4-гидроксипролин	188,1	86,2	83	12
Триптофан	261,16	244,1	83	4
Тирозин	238,1	136,1	83	12
Валин	174,15	72,2	83	12

цитофлуорометрии на приборе Cytoflex (Beckman Coulter; США) и составила более 92% CD14<sup>+</sup>-клеток. Подсчет числа клеток проводили на основании данных цитофлуорометрии. Аликвоту, содержащую 4–5 млн моноцитов, отделяли и 3 раза проводили промывку центрифугированием при 311 g в течение 5 мин с холодным 0,3%-м уксусом аммония. Полученный осадок клеток высушивали в атмосфере азота и хранили при –80 °C до экстракции в течение не более чем 6 месяцев.

#### Подготовка образцов для ЖХ-МС анализа

В исследовании использовали ацетонитрил, метанол, бутанол и хлороформ (степени очистки для жидкостной хроматографии), приобретенные у Merck (Дармштадт; Германия), а также водный раствор соляной кислоты 37% (Acros Organics; США). Деионизированную воду готовили с помощью установки Milli-Q Reference Water Purification System (Мольсем; Франция).

Приготовление образцов осуществляли согласно следующей процедуре: к образцу моноцитов добавляли 480 мкл раствора хлороформ/метанол (2:1, об./об.); образец подвергали ультразвуковому воздействию в течение 10 мин при комнатной температуре, добавляли 150 мкл воды, перемешивали в течение 5 мин; получившийся раствор центрифугировали при 13 000 g в течение 5 мин при комнатной температуре; отбирали 150 мкл верхнего водно-метанольного слоя; сушили в токе азота 30 мин при 60 °C; добавляли 200 мкл раствора соляной кислоты в бутаноле (0,1 моль/л); перемешивали

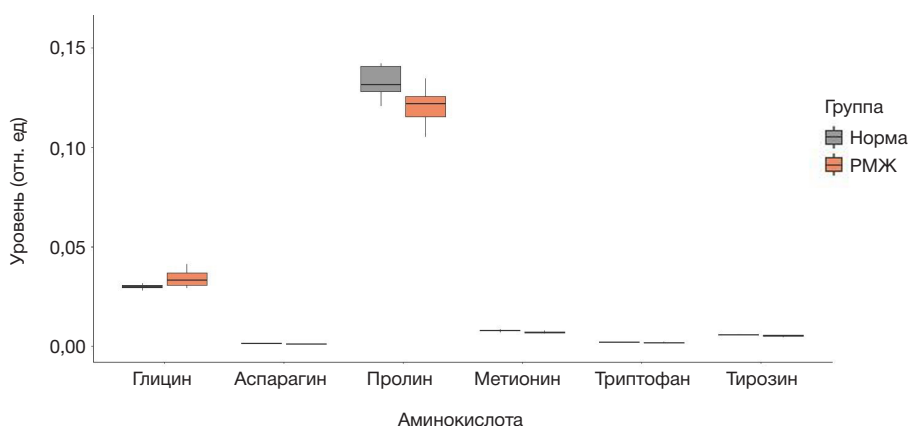
в течение 3 мин; центрифугировали при 13 000 g в течение 15 с при комнатной температуре; выдерживали при 60 °C в течение 15 мин для проведения реакции дериватизации; центрифугировали при 13 000 g в течение 15 с при комнатной температуре; сушили в токе азота 30 мин при 60 °C; перерастворяли в 300 мкл раствора ацетонитрил/вода (1/1 об./об.); перемешивали в течение 5 мин; центрифугировали при 13 000 g в течение 15 с при комнатной температуре; переносили 200 мкл полученного образца в вialу со вставкой для дальнейшего анализа.

#### ЖХ-МС-анализ и обработка данных

Анализ образцов осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе 1260 Infinity II (Agilent; США) с детектированием на масс-спектрометре 6460 Triple Quad (Agilent; США). Разделение образцов осуществляли методом жидкостной хроматографии с использованием колонки Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 2,1 × 100 мм, с диаметром сорбента 1,8 мкм (Agilent; США).

Для анализа аминокислот вводили 3 мкл образца и использовали следующие элюенты, подаваемые со скоростью потока 150 мкл/мин с поддерживаемой температурой колонки 20 °C, в качестве подвижной фазы: элюент А — 10 мМ раствор ацетата аммония в воде, элюент В — ацетонитрил. Состав подвижной фазы в ходе анализа изменялся в соответствии с табл. 1.

Транзитные переходы между ионами-предшественниками и ионами-продуктами для анализируемых аминокислот



**Рис. 1.** Бокс-диаграмма аминокислот, уровни которых в моноцитах статистически значимо различаются между группами «норма» и РМЖ. 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

приведены в табл. 2. Параметры источника ионов были следующие: температура осушающего газа — 150 °С, скорость потока осушающего газа — 10 л/мин, давление газа-распылителя — 2,76 Бар, температура газа-завесы — 400 °С, скорость потока газа-завесы — 10 л/мин, напряжение на капилляре — 2000 В.

Уровни метаболитов определяли с использованием программы QuantAnalysis (Agilent; США).

### Статистический анализ данных

Все данные были проанализированы в программной среде R (<http://www.r-project.org/>, версии R 4.1.1, 4.1.2). Начальную обработку таблиц данных производили с помощью пакетов tidyverse (версия 1.3.1) и readxl (1.3.1). Для визуализации результатов использовались ggplot2 (версия 3.3.5) и ggforestplot (версия 0.1.0).

Сравнение уровней аминокислот проводили с помощью непараметрического критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Для описания количественных данных использовали медианы (Me) и квартили  $Q_1$  и  $Q_3$ . Величину порогового уровня значимости  $p$  принимали равной 0,05.

Для оценки возможности классификации пациентов по группам на основании исследуемых параметров были разработаны модели логистической регрессии. В качестве независимых переменных в моделях рассматривали уровни отдельных аминокислот. В качестве зависимой переменной выступала принадлежность образца к группе

«норма» или «РМЖ». Из всех разработанных моделей выбирали четыре с наибольшей величиной площади под ROC-кривой (AUC). Качество разработанных моделей оценивали путем построения ROC-кривой, определения площади под ROC-кривой, а также расчета чувствительности и специфичности.

Для аминокислот, уровни которых различались в моноцитах от пациентов с РМЖ, проводили анализ вовлеченности в метаболические пути с помощью ресурса MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/home.xhtml>).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе анализа были получены полуколичественные данные о содержании 26 аминокислот в моноцитах здоровых доноров и пациентов с РМЖ. Список аминокислот включал в себя метил-гистидин, аминокислотную кислоту, 5-гидроксилизин, аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, цитруллин, цистин, глутаминовую кислоту, глютамин, глицин, гистидин, лейцин, лизин, метионин, орнитин, фенилаланин, пролин, саркозин, серин, треонин, транс-4-гидроксипролин, триптофан, тирозин, валин. Профиль аминокислот получали делением площади хроматографического пика каждой аминокислоты на суммарную площадь пиков всех аминокислот соответствующего образца. Для поиска различий профилей аминокислот в моноцитах, полученных от пациентов групп «норма» и «РМЖ», было выполнено

**Таблица 3.** Метаболические пути, в которые вовлечены аминокислоты со статистически значимым различием уровней в моноцитах от пациентов группы «норма» и «РМЖ» с использованием базы данных KEGG

Название метаболического пути	Общее число участвующих метаболитов	Число метаболитов, совпавших с экспериментальными данными	$P$	$-\log(P)$	Влияние на путь
Биосинтез фенилаланина, тирозина и триптофана	4	1	0,015	1,812	0,5
Метаболизм глицина, серина и треонина	33	1	0,121	0,916	0,246
Метаболизм триптофана	41	1	0,149	0,827	0,143
Метаболизм тирозина	42	1	0,152	0,818	0,14
Метаболизм глиоксилата и дикарбоксилата	32	1	0,118	0,929	0,106
Метаболизм цистеина и метионина	33	1	0,121	0,916	0,104
Метаболизм глутатиона	28	1	0,104	0,984	0,089
Метаболизм аргинина и пролина	38	1	0,139	0,858	0,078
Первичный биосинтез желчных кислот	46	1	0,166	0,781	0,008

**Таблица 4.** Метаболические пути, в которые вовлечены аминокислоты со статистически значимым отличием уровней в моноцитах от пациентов группы «норма» и «РМЖ» с использованием базы данных SMPDB

Название метаболического пути	Общее число участвующих метаболитов	Число метаболитов, совпавших с экспериментальными данными	<i>P</i>	–Log ( <i>P</i> )	Влияние на путь
Метаболизм аспартата	34	1	0,158	0,802	0,25
Метаболизм фенилаланина и тирозина	25	1	0,118	0,928	0,221
Метаболизм глутатиона	19	1	0,091	1,042	0,061
Метаболизм глицина и серина	50	2	0,022	1,66	0,048
Переработка аммиака	25	2	0,006	2,249	0,033
Метаболизм метионина	39	1	0,179	0,747	0,009

сравнение данных, полученных с помощью ЖХ-МС, методом Уилкоксона–Манна–Уитни. Статистически значимые различия уровней метаболитов обнаружены для глицина ( $p$ -value = 0,0127), аспарагина ( $p$ -value = 0,0197), пролина ( $p$ -value = 0,0159), метионина ( $p$ -value = 0,0357), триптофана ( $p$ -value = 0,0028), тирозина ( $p$ -value = 0,0127) (рис. 1).

Для аминокислот, уровни которых статистически значимо различались между моноцитами групп «норма» и «РМЖ» был выполнен биоинформатический анализ метаболических путей с их участием. Анализ проводили с использованием ресурса MetaboAnalyst. В результате были определены биологические сети, которые потенциально могут быть вовлечены в изменение фенотипа моноцитов под воздействием РМЖ. В ходе анализа данных, представленных в базе KEGG и SMPDB (табл. 3, 4), были выявлены пути, упорядоченные по уровням значимости (анализ обогащения путей — ось ординат на рис. 2) и значениям влияния рассматриваемых метаболитов на путь (анализ топологии пути — ось абсцисс на рис. 2). Цвет узла соответствует уровню значимости, а радиус узла коррелирует с величиной влияния на путь. Влияние на путь рассчитывали как сумму показателей значимости соответствующих метаболитов, деленную на сумму показателей значимости всех метаболитов в каждом пути. Оценку обогащения метаболических путей выполняли с помощью анализа избыточного представления

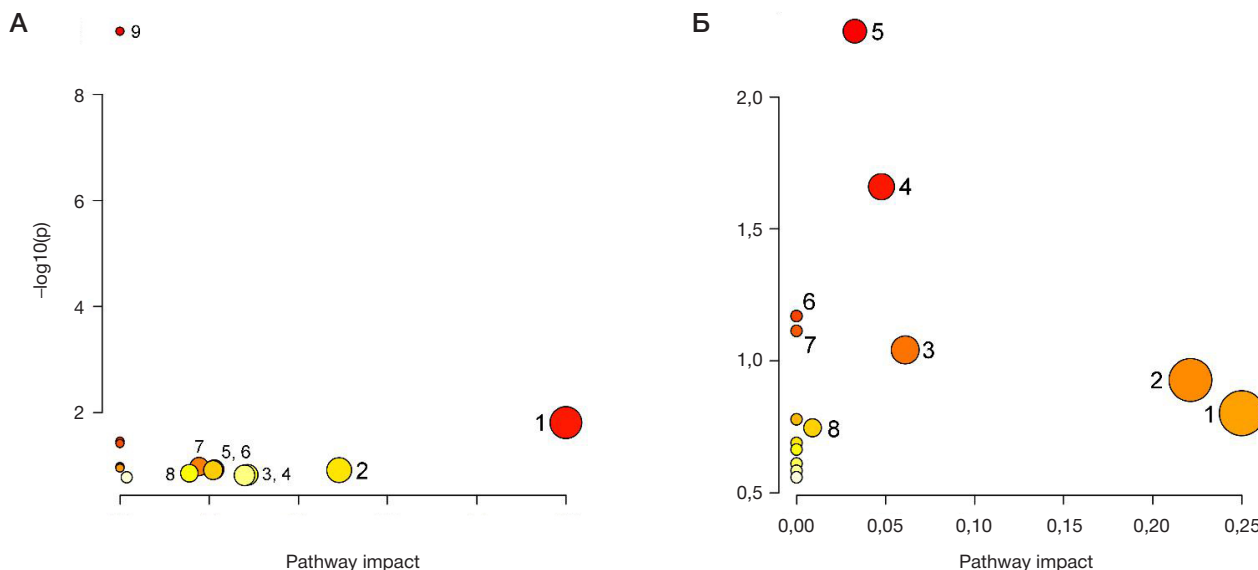
(Over representation analysis, ORA) с использованием гипергеометрического теста.

Для проверки возможности диагностики РМЖ по уровням аминокислот в моноцитах были разработаны модели логистической регрессии по каждой из значимых аминокислот (рис. 3А), а также рассмотрены модели с использованием комбинации аминокислот и выбраны четыре с наибольшим значением площади под операционной кривой (AUC) по результатам ROC-анализа (рис. 3Б). В табл. 5 приведены результаты оценки качества моделей, построенных на одной аминокислоте. Модели, построенные на комбинации аминокислот, характеризовались AUC = 1 и 100%-й чувствительностью и специфичностью (рис. 3Б).

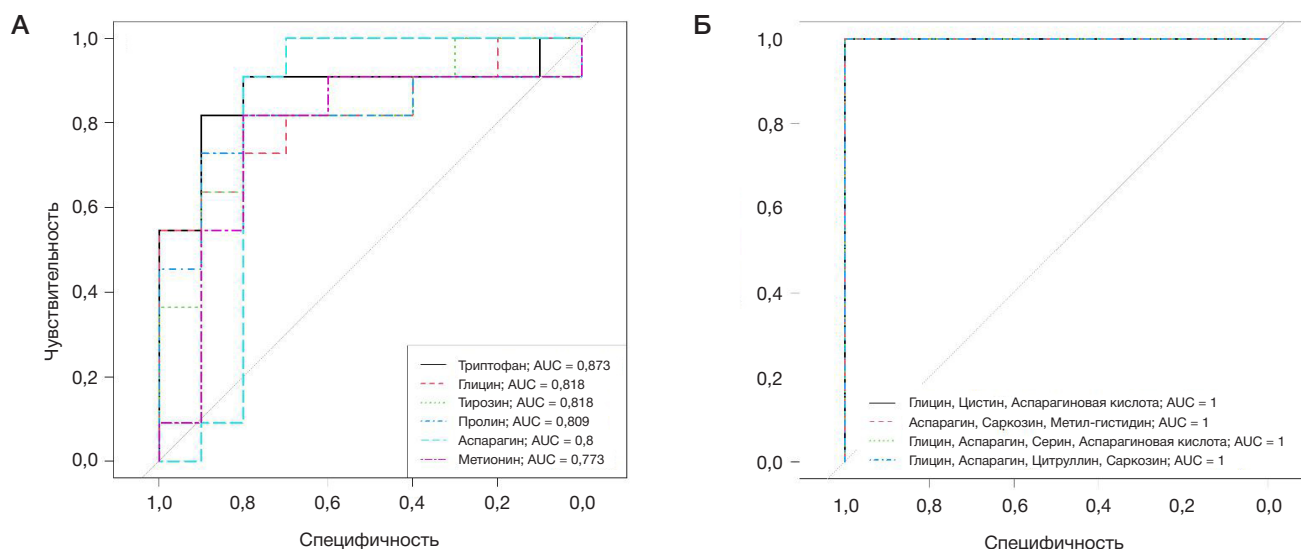
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из 26 проанализированных аминокислот уровни шести статистически значимо различались между моноцитами, взятыми у здоровых доноров и пациентов с РМЖ. Из этих шести аминокислот особый интерес представляют глицин, триптофан и аспарагин, поскольку нарушения связанных с ними метаболических путей ассоциируют с изменениями, вызванными опухолевыми процессами [11, 13, 14, 18, 27, 31].

Доступность в течение определенного времени незаменимой аминокислоты триптофана является важным фактором, определяющим силу и качество иммунного



**Рис. 2.** Результат анализа метаболических путей, в которые вовлечены аминокислоты со статистически значимым различием уровней в моноцитах от пациентов группы «норма» и «РМЖ». **А.** Анализ с использованием базы данных KEGG: 1 — биосинтез фенилаланина, тирозина и триптофана; 2 — метаболизм глицина, серина и треонина; 3 — метаболизм триптофана; 4 — метаболизм тирозина; 5 — метаболизм гликозилата и дикарбоксилата; 6 — метаболизм цистеина и метионина; 7 — метаболизм глутатиона; 8 — метаболизм аргинина и пролина; 9 — биосинтез аминокислот-тРНК. **Б.** Анализ с использованием базы данных SMPDB: 1 — метаболизм аспартата; 2 — метаболизм фенилаланина и тирозина; 3 — метаболизм глутатиона; 4 — метаболизм глицина и серина; 5 — рециркуляция аммиака; 6 — метаболизм аланина; 7 — синтез карнитина; 8 — метаболизм метионина



**Рис. 3.** ROC-кривые моделей логистической регрессии, в которой в качестве независимой переменной выступали уровни аминокислот в моноцитах, в качестве зависимой переменной — принадлежность образца к группе «норма» или «РМЖ». На вставках указаны аминокислоты, уровни которых взяты в качестве независимой переменной, а также площадь под операционной кривой для соответствующей модели логистической регрессии. ROC-кривые построены по результатам анализа каждой из статистически значимо различающихся аминокислот (А), а также комбинации аминокислот (Б)

ответа. Проллиферация и активация Т-клеток человека были сильно подавлены в средах, не содержащих триптофан, по сравнению с обычными питательными средами [32, 33]. Раковые клетки, ОАМ и ассоциированные с раком фибробласты могут снижать уровень триптофана за счет ферментативной активности индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) [13]. ОАМ, а иногда и сами опухолевые клетки, повышают уровень IDO и создают иммуносупрессивную среду с помощью, по меньшей мере, двух механизмов: истощения триптофана и накопления катаболитов триптофана, таких как кинуренин, 3-гидроксиантракилат и хинолинат [34, 35]. Истощение триптофана ингибирует распространение активированных Т-клеток, а катаболиты, полученные из триптофана, действуют как лиганды рецепторов ароматических углеводородов [36]. Кинуренин является супрессором Т-клеточного иммунитета. Стимулируя рецепторы ароматических углеводородов, он направляет дифференцировку наивных Т-клеток в сторону регуляторных Т-клеток и подавляет дифференцировку Th17-клеток [22, 37].

Биосинтез серина, глицина и метаболизм одноуглеродных фрагментов имеют решающее значение для поддержания выживания и пролиферации раковых клеток и обладают высокой клинической значимостью. Чрезмерная активация биосинтеза серина и глицина приводит к онкогенезу, обеспечивая субстрат для одноуглеродного метаболизма. Одноуглеродный метаболизм, представляющий собой циклическую метаболическую сеть, основанную на химической реакции соединений фолиевой кислоты, обеспечивает необходимые белки, нуклеиновые кислоты, липиды и

другие биологические макромолекулы для поддержки роста опухоли [31].

Было обнаружено, что аспарагин может влиять на рост раковых клеток [38], что привело к использованию бактериального фермента L-аспарагиназы для ограничения доступности аспарагина [14, 39]. Значительные усилия прилагаются к разработке средств для истощения других аминокислот и воздействия на центральные метаболические пути, регуляция которых нарушена в раковых клетках, включая гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и липогенез. Многие из этих препаратов все еще находятся на доклинических стадиях, однако некоторые в настоящее время проходят оценку в ходе клинических испытаний [14].

## ВЫВОДЫ

В результате данного исследования было выявлено шесть аминокислот, уровни которых статистически значимо различаются в моноцитах пациентов с раком молочной железы от моноцитов здоровых доноров. Статистически значимые различия уровней метаболитов обнаружены для глицина ( $p$ -value = 0,0127), аспарагина ( $p$ -value = 0,0197), пролина ( $p$ -value = 0,0159), метионина ( $p$ -value = 0,0357), триптофана ( $p$ -value = 0,0028), тирозина ( $p$ -value = 0,0127). В результате биоинформатического анализа метаболических путей с участием задействованных аминокислот были определены биологические сети, которые потенциально могут быть вовлечены в изменение фенотипа моноцитов под воздействием РМЖ. Обнаруженные

**Таблица 5.** Характеристики моделей логистической регрессии, позволяющих прогнозировать РМЖ по содержанию отдельных аминокислот, уровни которых в моноцитах статистически значимо различаются между группой «норма» и «РМЖ»

Аминокислоты	AUC	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность	Положительная предсказательная ценность
Триптофан	0,87	0,53	0,91 (0,55; 1)	0,9 (0,7; 1)	0,92 (0,77; 1)
Глицин	0,82	0,74	0,73 (0,36; 1)	1 (0,6; 1)	1 (0,71; 1)
Тирозин	0,82	0,46	0,82 (0,45; 1)	0,9 (0,5; 1)	0,9 (0,67; 1)
Пролин	0,81	0,57	0,82 (0,45; 1)	0,9 (0,7; 1)	0,91 (0,73; 1)
Аспарагин	0,8	0,45	1 (0,82; 1)	0,8 (0,5; 1)	0,85 (0,69; 1)
Метионин	0,77	0,51	0,82 (0,55; 1)	0,8 (0,5; 1)	0,83 (0,67; 1)



изменения содержания аминокислот в моноцитах могут свидетельствовать о влиянии опухолевых процессов не только на микроокружение, но и опосредованно на отдаленных участников иммунной системы. На

основании найденных различий была предложена модель, обладающая 100%-й специфичностью и чувствительностью, позволяющая диагностировать РМЖ по аминокислотному профилю моноцитов.

## Литература

1. Kzhyshkowska J, Gudima A, Moganti K, Gratchev A, Orekhov A. Perspectives for Monocyte/Macrophage-Based Diagnostics of Chronic Inflammation. *Transfus Med Hemotherapy*. 2016; 43 (2): 66–77.
2. Nikitina E, Larionova I, Choinzonov E, Kzhyshkowska J. Monocytes and macrophages as viral targets and reservoirs. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (9). DOI: 10.3390/ijms19092821.
3. Patysheva M, Larionova I, Stakheyeva M, Grigoryeva E, Iamshchikov P, Tarabanovskaya N, et al. Effect of Early-Stage Human Breast Carcinoma on Monocyte Programming. *Front Oncol*. 2022; 11 (February): 1–12.
4. Matuschik L, Riabov V, Schmuttermayer C, Sevastyanova T, Weiss C, Klüter H, et al. Hyperglycemia Induces Inflammatory Response of Human Macrophages to CD163-Mediated Scavenging of Hemoglobin-Haptoglobin Complexes. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (3): 1–19.
5. Patysheva M, Frolova A, Larionova I, Afanas'ev S, Tarasova A, Cherdyntseva N, et al. Monocyte programming by cancer therapy. *Front Immunol*. 2022; 13 (October): 1–21.
6. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011; 475 (7355): 222–5.
7. Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science* (80- ). 2015; 350 (6263): 985–90.
8. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11 (11): 762–74.
9. Engblom C, Pfirschke C, Pittet MJ. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16 (7): 447–62.
10. Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. Fuel feeds function: Energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5 (11): 844–52.
11. Andrejeva G, Rathmell JC. Similarities and Distinctions of Cancer and Immune Metabolism in Inflammation and Tumors. *Cell Metab*. 2017; 26 (1): 49–70.
12. Bauer DE, Harris MH, Plas DR, Lum JJ, Hammerman PS, Rathmell JC, et al. Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. *FASEB J*. 2004; 18 (11): 1303–5.
13. Leone RD, Powell JD. Metabolism of immune cells in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2020; 20 (9): 516–31.
14. Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, Lewis CA, Heiden MG, Vander, Locasale JW. Metabolomics in Cancer Research and Emerging Applications in Clinical Oncology. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71 (4): 333–58.
15. Odom JD, Sutton VR. Metabolomics in Clinical Practice: Improving Diagnosis and Informing Management. *Clin Chem*. 2021; 67 (12): 1606–17.
16. Clish CB. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Mol Case Stud*. 2015; 1 (1): a000588.
17. Wishart DS. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat Rev Drug Discov*. 2016; 15 (7): 473–84.
18. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolari T, Castegna A. The metabolic signature of macrophage responses. *Front Immunol*. 2019; 10 (JULY): 1–16.
19. Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*. 2012; 3 (3): 271–9.
20. Van den Bossche J, Baardman J, Otto NA, van der Velden S, Neele AE, van den Berg SM, et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep*. 2016; 17 (3): 684–96.
21. Qualls JE, Subramanian C, Rafi W, Smith AM, Defreitas AA, Shirey KA, et al. Sustained generation of nitric oxide and control of mycobacterial infection requires argininosuccinate synthase 1. *Cell Host Microbe*. 2012; 12 (3): 313–23.
22. Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В., редакторы. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018; 250 с.
23. Cassetta L, Pollard JW. Repolarizing macrophages improves breast cancer therapy. *Cell Res*. 2017; 27 (8): 963–4.
24. Kuang DM, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang JP, Wu C, et al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med*. 2009; 206 (6): 1327–37.
25. De Sanctis F, Adamo A, Canè S, Ugel S. Targeting tumour-reprogrammed myeloid cells: the new battleground in cancer immunotherapy. *Semin Immunopathol*. 2022; (0123456789). DOI: 10.1007/s00281-022-00965-1.
26. Nguyen PHD, Wasser M, Tan CT, Lim CJ, Lai HLH, Seow JJW, et al. Trajectory of immune evasion and cancer progression in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 1–13.
27. Zhu Y, Li X, Wang L, Hong X, Yang J. Metabolic reprogramming and crosstalk of cancer-related fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13 (August): 1–26.
28. Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, Stakheyeva M, Cherdyntseva N, Pavlov V, et al. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Front Oncol*. 2020; 10 (October): 1–34.
29. Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2019; 8 (7): 1–15.
30. Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol*. 2019; 106 (2): 309–22.
31. Pan S, Fan M, Liu Z, Li X, Wang H. Serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer (Review). *Int J Oncol*. 2021; 58 (2): 158–70.
32. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*. 2005; 22 (5): 633–42.
33. Munn BDH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T Cell Proliferation by Macrophage. 1999; 189 (9): 1363–72.
34. Platten M, Wick W, Van Den Eynde BJ. Tryptophan catabolism in cancer: Beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Res*. 2012; 72 (21): 5435–40.
35. Moffett JR, Nambodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol*. 2003; 81 (4): 247–65.
36. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahn F, Ott M, Tritschler I, Trump S, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011; 478 (7368): 197–203.
37. Stephens GL, Wang Q, Swerdlow B, Bhat G, Kolbeck R, Fung M. Kynurenine 3-monooxygenase mediates inhibition of Th17 differentiation via catabolism of endogenous aryl hydrocarbon receptor ligands. *Eur J Immunol*. 2013. 43 (7): 1727–34. DOI: 10.1002/eji.201242779.
38. REN, TA M. Dual Requirement of Walker Carcinosarcoma 256 in vitro for Asparagine and Glutamine. *Science*. 1956; 124 (3212): 124–5.
39. Clavell LA, Gelber RD, Cohen HJ, Suzanne Hitchcock-Bryan RN, Cassady JR, Tarbel NJ, et al. Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1986; 315: 657–63.

## References

- Kzhyshkowska J, Gudima A, Moganti K, Gratchev A, Orekhov A. Perspectives for Monocyte/Macrophage-Based Diagnostics of Chronic Inflammation. *Transfus Med Hemotherapy*. 2016; 43 (2): 66–77.
- Nikitina E, Larionova I, Choinzonov E, Kzhyshkowska J. Monocytes and macrophages as viral targets and reservoirs. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (9). DOI: 10.3390/ijms19092821.
- Patysheva M, Larionova I, Stakheyeva M, Grigoryeva E, Iamshchikov P, Tarabanovskaya N, et al. Effect of Early-Stage Human Breast Carcinoma on Monocyte Programming. *Front Oncol*. 2022; 11 (February): 1–12.
- Matuschik L, Riabov V, Schmuttermair C, Sevastyanova T, Weiss C, Klüter H, et al. Hyperglycemia Induces Inflammatory Response of Human Macrophages to CD163-Mediated Scavenging of Hemoglobin-Haptoglobin Complexes. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (3): 1–19.
- Patysheva M, Frolova A, Larionova I, Afanas'ev S, Tarasova A, Cherdynseva N, et al. Monocyte programming by cancer therapy. *Front Immunol*. 2022; 13 (October): 1–21.
- Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011; 475 (7355): 222–5.
- Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science* (80- ). 2015; 350 (6263): 985–90.
- Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11 (11): 762–74.
- Engblom C, Pfirschke C, Pittet MJ. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16 (7): 447–62.
- Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. Fuel feeds function: Energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5 (11): 844–52.
- Andrejeva G, Rathmell JC. Similarities and Distinctions of Cancer and Immune Metabolism in Inflammation and Tumors. *Cell Metab*. 2017; 26 (1): 49–70.
- Bauer DE, Harris MH, Plas DR, Lum JJ, Hammerman PS, Rathmell JC, et al. Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. *FASEB J*. 2004; 18 (11): 1303–5.
- Leone RD, Powell JD. Metabolism of immune cells in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2020; 20 (9): 516–31.
- Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, Lewis CA, Heiden MG Vander, Locasale JW. Metabolomics in Cancer Research and Emerging Applications in Clinical Oncology. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71 (4): 333–58.
- Odom JD, Sutton VR. Metabolomics in Clinical Practice: Improving Diagnosis and Informing Management. *Clin Chem*. 2021; 67 (12): 1606–17.
- Clish CB. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Mol Case Stud*. 2015; 1 (1): a000588.
- Wishart DS. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat Rev Drug Discov*. 2016; 15 (7): 473–84.
- Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The metabolic signature of macrophage responses. *Front Immunol*. 2019; 10 (JULY): 1–16.
- Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*. 2012; 3 (3): 271–9.
- Van den Bossche J, Baardman J, Otto NA, van der Velden S, Neele AE, van den Berg SM, et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep*. 2016; 17 (3): 684–96.
- Qualls JE, Subramanian C, Rafi W, Smith AM, Defreitas AA, Shirey KA, et al. Sustained generation of nitric oxide and control of mycobacterial infection requires argininosuccinate synthase 1. *Cell Host Microbe*. 2012; 12 (3): 313–23.
- Kaprin AD, Starinskij VV, Petrova GV, redaktory. *Zlokachestvennye novooobrazovaniya v Rossii v 2017 godu (zabolevaemost' i smertnost')*. M.: MNIOI im. P. A. Gercena — filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii, 2018; 250 s. Russian.
- Cassetta L, Pollard JW. Repolarizing macrophages improves breast cancer therapy. *Cell Res*. 2017; 27 (8): 963–4.
- Kuang DM, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang JP, Wu C, et al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med*. 2009; 206 (6): 1327–37.
- De Sanctis F, Adamo A, Canè S, Ugel S. Targeting tumour-reprogrammed myeloid cells: the new battleground in cancer immunotherapy. *Semin Immunopathol*. 2022; (0123456789). DOI: 10.1007/s00281-022-00965-1.
- Nguyen PHD, Wasser M, Tan CT, Lim CJ, Lai HLH, Seow JJW, et al. Trajectory of immune evasion and cancer progression in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 1–13.
- Zhu Y, Li X, Wang L, Hong X, Yang J. Metabolic reprogramming and crosstalk of cancer-related fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13 (August): 1–26.
- Larionova I, Tuguzbaeva G, Ponomaryova A, Stakheyeva M, Cherdynseva N, Pavlov V, et al. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Front Oncol*. 2020; 10 (October): 1–34.
- Larionova I, Cherdynseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncimmunology*. 2019; 8 (7): 1–15.
- Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol*. 2019; 106 (2): 309–22.
- Pan S, Fan M, Liu Z, Li X, Wang H. Serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer (Review). *Int J Oncol*. 2021; 58 (2): 158–70.
- Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*. 2005; 22 (5): 633–42.
- Munn BDH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T Cell Proliferation by Macrophage. 1999; 189 (9): 1363–72.
- Platten M, Wick W, Van Den Eynde BJ. Tryptophan catabolism in cancer: Beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Res*. 2012; 72 (21): 5435–40.
- Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol*. 2003; 81 (4): 247–65.
- Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011; 478 (7368): 197–203.
- Stephens GL, Wang Q, Swerdlow B, Bhat G, Kolbeck R, Fung M. Kynurenine 3-monooxygenase mediates inhibition of Th17 differentiation via catabolism of endogenous aryl hydrocarbon receptor ligands. *Eur J Immunol*. 2013. 43 (7): 1727–34. DOI: 10.1002/eji.201242779.
- RE N, TA M. Dual Requirement of Walker Carcinosarcoma 256 in vitro for Asparagine and Glutamine. *Science*. 1956; 124 (3212): 124–5.
- Clavell LA, Gelber RD, Cohen HJ, Suzanne Hitchcock-Bryan RN, Cassidy JR, Tarbel NJ, et al. Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1986; 315: 657–63.

## РОЛЬ КЛАСТЕРИНА В ПРОГНОЗИРОВАНИИ РАЗВИТИЯ РАННЕЙ И ПОЗДНЕЙ ПРЕЭКЛАМПСИИ В ПЕРВОМ ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ

А. В. Тимофеева<sup>✉</sup>, И. С. Федоров, А. М. Тарасова, К. А. Горина, Ю. В. Сухова, В. А. Гусар, Т. Ю. Иванец

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

Преэклампсия (ПЭ) встречается в 2–8% беременностей, является одной из важнейших причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. На сегодняшний день нет используемых в клинической практике тест-систем, позволяющих с высокой точностью прогнозировать на 11–14-й неделе беременности ранний дебют ПЭ (с 20-й по 34-ю неделю) или поздний дебют ПЭ (после 34-й недели). Целью исследования было оценить возможности использования количественного определения секреторной формы кластерина в прогнозировании развития ранней и поздней ПЭ в первом триместре беременности. Выбор данного белка обусловлен специфичностью его экспрессии для клеток цитотрофобласта, синцитиотрофобласта и внеклеточного трофобласта, а также доказанным негативным влиянием кластерина на инвазивные свойства трофобластных клеток и гестационные преобразования сосудов матки, играющих ключевую роль в патогенезе ПЭ. В исследование включены 40 беременных в возрасте от 27–40 лет, проходивших комплексное скрининговое обследование в первом триместре беременности. Методом Вестерн-блоттинга обнаружено значимое повышение уровня секреторного кластерина (40 кДа) в сыворотке крови беременных в случае развития ПЭ относительно физиологической беременности: при ранней ПЭ — двукратное увеличение уровня кластерина в везикулярной и вневезикулярной фракции сыворотки крови ( $p = 0,03$  и  $p = 0,004$  соответственно), при поздней ПЭ — трехкратное увеличение только во вневезикулярной фракции сыворотки крови ( $p = 0,002$ ). Согласно моделям логистической регрессии уровень секреторного кластерина во вневезикулярной фракции сыворотки крови беременных в первом триместре обладает прогностической значимостью при оценке вероятности развития ранней ПЭ ( $AUC = 0,97$ ,  $Se = 1$ ,  $Sp = 0,875$ ,  $cutoff = 0,3877$ ) и поздней ПЭ ( $AUC = 1$ ,  $Se = 1$ ,  $Sp = 1$ ,  $cutoff = 0,5$ ).

**Ключевые слова:** сыворотка периферической крови, везикулы, плацента, кластерин, преэклампсия, Вестерн-блоттинг, мкРНК, количественная ПЦР в реальном времени

**Финансирование:** работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках гранта № 22-15-00363 «Эпигенетические и биохимические аспекты патологии беременности при нарушениях инвазивных свойств трофобласта: от ранней диагностики к профилактике материнской и перинатальной заболеваемости» в соответствии с соглашением № 22-15-00363 между Российским научным фондом, руководителем проекта Тимофеевой А. В. и НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова о предоставлении гранта на проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований от 13.05.2022 г.

**Вклад авторов:** А. В. Тимофеева — планирование исследования, проведение количественной ПЦР в реальном времени, проведение Вестерн-блоттинга, написание и редактирование рукописи; И. С. Федоров — пробоподготовка, проведение Вестерн-блоттинга, статистическая обработка данных; А. М. Тарасова — пробоподготовка и проведение Вестерн-блоттинга; К. А. Горина — клиническая характеристика пациенток; Ю. В. Сухова — формирование групп пациенток для исследования, В. А. Гусар — анализ полученных данных; Т. Ю. Иванец — скрининг в 1-м триместре беременности.

**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 1964 г. 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:** Анжелика Владимировна Тимофеева  
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; v\_timofeeva@oparina4.ru, avtimofeeva28@gmail.com

**Статья получена:** 23.11.2022 **Статья принята к печати:** 17.12.2022 **Опубликована онлайн:** 28.12.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.061

## ROLE OF CLUSTERIN IN PREDICTING DEVELOPMENT OF EARLY- AND LATE-ONSET PREECLAMPSIA IN THE FIRST TRIMESTER OF PREGNANCY

Timofeeva AV<sup>✉</sup>, Fedorov IS, Tarasova AM, Gorina KA, Suhova YuV, Gusar VA, Ivanets TyU

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

Preeclampsia (PE) occurs in 2–8% of pregnancies. It is one of the leading causes of maternal and perinatal morbidity and mortality. Today, there are no tests adopted by the practitioners that enable accurate prediction of early (weeks 20 through 34) or late (after week 34) onset of PE when the pregnancy is in its 11th to 14th week. This study aimed to evaluate the feasibility of using secretory clusterin quantification to predict early or late PE during the first trimester of pregnancy. The choice of this protein is determined, on the one hand, by the specificity of its expression for cytotrophoblast, syncytiotrophoblast, and extracellular trophoblast cells, and, on the other hand, by the proven negative effect of clusterin on the invasive properties of trophoblastic cells and gestational transformations of uterine vessels, which play a key role in the pathogenesis of PE. The study included 40 pregnant women aged 27–40 years who underwent a comprehensive screening examination in the first trimester of pregnancy. Western blotting revealed a significant increase in the level of secretory clusterin (40 kDa) in the blood serum of pregnant women in the case of PE compared to physiological pregnancy: in early-onset PE, a twofold increase in the level of clusterin in the vesicular and extravesicular fractions of blood serum ( $p = 0.03$  and  $p = 0.004$ , respectively), with late-onset PE — a threefold increase only in the extravesicular fraction of blood serum ( $p = 0.002$ ). According to logistic regression models, the level of secretory clusterin in the extravesicular fraction of blood serum of pregnant women in the first trimester has prognostic significance in assessing the likelihood of developing early-onset PE ( $AUC = 0.97$ ,  $Se = 1$ ,  $Sp = 0.875$ ,  $cutoff = 0.3877$ ) and late-onset PE ( $AUC = 1$ ,  $Se = 1$ ,  $Sp = 1$ ,  $cutoff = 0.5$ ).

**Keywords:** peripheral blood serum, vesicles, placenta, clusterin, preeclampsia, Western blotting, miRNA, quantitative real-time PCR

**Funding:** the work was financially supported by the Russian Science Foundation under grant #22-15-00363 "Epigenetic and biochemical aspects of the pathology of pregnancy in violations of the invasive properties of the trophoblast: from early diagnosis to the prevention of maternal and perinatal morbidity", under the Agreement #22-15-00363 of May 13, 2022 for provision of a grant to support fundamental and basic research, made between the Russian Science Foundation, Angelika Vladimirovna Timofeeva (principal researcher/manager for the study) and V. I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.

**Author contribution:** Timofeeva AV — study planning, quantitative real-time PCR, Western blotting, manuscript authoring and editing; Fedorov IS — preparation of samples, Western blotting, statistical processing of the data; Tarasova AM — preparation of samples and Western blotting; Gorina KA — clinical profiling of the patients; Suhova YuV — formation of groups of patients for the study, Gusar VA — analysis of the data obtained; Ivanets TyU — screening in the 1<sup>st</sup> trimester of pregnancy.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (Minutes #13 of December 10, 2020), conducted in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki of 1964, Federal Law "On the Fundamentals of Protecting the Health of Citizens in the Russian Federation" #323 -FZ of November 21, 2011 All patients signed a voluntary informed consent form to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Angelika V. Timofeeva  
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; v\_timofeeva@oparina4.ru, avtimofeeva28@gmail.com

**Received:** 23.11.2022 **Accepted:** 17.12.2022 **Published online:** 28.12.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.061

Преэклампсия (ПЭ) является мультисистемным осложнением 3–8% всех беременностей [1], обуславливает 16–18% случаев материнской смертности и 40% случаев смерти плода и новорожденных [2]. В соответствии с Международным обществом по изучению гипертензии при беременности (ISSHP) ПЭ определяют как наличие вновь возникшей гипертензии (более 140/90 мм рт. ст.) после 20 недель беременности, сопровождающейся протеинурией (не менее 0,3 г/л в суточной моче) или признаками острой почечной недостаточности, дисфункцией печени, неврологическими расстройствами, гемолизом или тромбоцитопенией, или внутриутробной задержкой развития плода. В зависимости от времени возникновения клинических симптомов различают раннюю и позднюю ПЭ (дебют заболевания до или после 34-й недели беременности соответственно) [3] [[https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/637\\_1](https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/637_1)], причем ранняя ПЭ характеризуется наиболее тяжелым течением и составляет 5–20% в структуре всех видов ПЭ. Неблагоприятные исходы для плода связаны с формированием хронической гипоксии и высокой частотой задержки развития, а также вызывают у плода осложнения, обусловленные недоношенностью, включая респираторный дистресс-синдром, инфекционно-воспалительные заболевания, внутрижелудочковые кровоизлияния, церебральный паралич, задержку когнитивных функций, аутизм, психомоторные, поведенческие расстройства и/или неспособность к обучению [4, 5].

Основополагающую роль в патогенезе ПЭ играют материнские и/или плацентарные факторы, что предопределяет время возникновения клинических проявлений ПЭ и их тяжесть. К плацентарным факторам относят нарушения пролиферации и дифференцировки клеток трофобласта на доимплантационном этапе при возникновении ошибок реализации эмбриональной программы и на последующих этапах имплантации вследствие воспалительных изменений в децидуальном слое, влияющих на взаимодействие клеток трофобласта и эндометрия [6–8]. Нарушение дифференцировки клеток вневорсинчатого трофобласта приводит к недостаточному ремоделированию спиральных маточных артерий: сначала в децидуальном сегменте на сроке до 10-й недели беременности, что проявляется в виде сниженной обструкции артерий эндovasкулярными клетками трофобласта и, как следствие, повреждению ворсин плаценты реактивными формами кислорода и азота [9], а затем в сегментах миометрия с 16-й по 18-ю неделю беременности [10]. Результатом аномальной реструктуризации маточных артерий является увеличение резистентности маточных артерий, механическое повреждение ворсин плаценты из-за повышенного давления крови, поступающей в межворсинчатое пространство [11–14], и в итоге гипоксически/ишемические изменения плацентарной ткани ввиду нарушений маточно-плацентарного кровотока [1, 15]. Из ишемизированной плаценты происходит выброс различных биологических факторов, вызывающих системное повреждение эндотелия сосудов и возникновение острой полиорганной недостаточности у матери. При ПЭ доказаны такие изменения уровня циркулирующих в крови плацентарных факторов, как снижение концентрации ассоциированного с беременностью белка А плазмы (PAPP-A) и плацентарного ростового фактора (PlGF) наряду с повышенным образованием растворимой fms-подобной тирозинкиназы-1, уровнем фактора роста

эндотелия сосудов А (VEGF-A), ингибина А, активина А, прокоагулянта Р-селектина, провоспалительного интерлейкина 2 и фактора некроза опухолей альфа и др. [1, 16–18]. К материнским патогенетическим факторам относят генетическую предрасположенность, иммунологические факторы, хронические заболевания у матери (метаболический синдром, сахарный диабет, хроническую артериальную гипертензию), которые могут вносить вклад в регуляцию процесса плацентации, равно как и усугублять восприимчивость материнского организма к факторам, выделяемым ишемизированной тканью плаценты, что ускоряет появление клинических симптомов у матери [19].

В поисках причин временных различий проявления клинических симптомов ПЭ были сопоставлены данные профилирования метилома ДНК клеток трофобласта, плацентарного транскриптома и материнского протеома при ранней и поздней ПЭ [20]. Выявлено влияние секретома сыворотки крови женщин с ПЭ на возникновение стресса эндоплазматического ретикулума (функциональной перегрузки аппарата секреции белка из-за нарушения процессов укладки белковых молекул) в клетках трофобласта [21], причем степень активации системы утилизации неправильно уложенных белков оказалась различной при ранней и поздней ПЭ [22, 23].

Таким образом, тщательный анализ изменений секретома плаценты позволит понять различия патогенеза ранней и поздней ПЭ. В нашем предыдущем исследовании [24] мы обнаружили снижение уровня секреторной формы кластерина в плазме крови женщин при вращении плаценты — осложнении беременности, характеризующемся чрезмерной инвазией клеток трофобласта и повышенным уровнем ангиогенных факторов, т. е. кардинально противоположными процессами, наблюдаемыми при ПЭ. Кластерин является внутри- и внеклеточным шапероном. Он играет важную роль в индуцированном стрессом белковом гомеостазе (протеостазе), и его активность зависит от степени гликозилирования в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) [25, 26]. Кластерин экспрессируется во многих тканях человека, в том числе в клетках цитотрофобласта, синцитиотрофобласта и вневорсинчатого трофобласта [27]. Известно его свойство ингибировать эпителиально-мезенхимальный переход при фенотипической трансформации клеток трофобласта, что снижает их миграцию и инвазию путем подавления уровня экспрессии матриксной металлопротеиназы 9 и виментина и увеличения экспрессии Е-кадгерина [27]. При физиологических условиях кластерин в основном секретируется во внеклеточное пространство после посттрансляционной модификации в ЭПР и аппарате Гольджи, образует комплексы с неправильно свернутыми белками, которые интернализуются рецептор-опосредованным эндоцитозом и затем направляются в аутофагосомы для деградации. Во время стресса ЭПР, например, как следствие окислительного стресса, кластерин высвобождается из ЭПР в цитозоль для формирования комплексов с белками неправильной укладки и направленного транспорта в протеасомы для деградации [28]. Выраженная экспрессия маркеров стресса ЭПР приводит к активации сигнальных путей, участвующих в воспалении и апоптозе — процессах, поддерживающих накопление неправильно свернутых белковых молекул и усугубляющих патологический процесс.

Участие кластерина в процессах, индуцированных стрессом ЭПР, чрезмерные проявления которого



характерны для ПЭ, специфичность его экспрессии в клетках трофобласта и наличие секреторной формы данного белка послужили отправной точкой для проведения научного исследования, целью которого было оценить значение в прогнозировании развития ранней и поздней ПЭ уровня секреторного кластера в разных фракциях сыворотки крови женщин (везикулярной и вневезикулярной) в первом триместре беременности.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Все пациентки, включенные в настоящее исследование, обратились в Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова (ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова») для ведения беременности и родов.

В первую когорту пациенток вошли 40 беременных в возрасте 27–40 лет, проходивших комплекс исследований

в рамках скрининга первого триместра беременности и сформировавших четыре группы (табл. 1): 1) 10 женщин с низким риском развития ПЭ по данным скрининга первого триместра (по данным программы Astraia) с физиологическим течением беременности и родивших доношенных детей; 2) девять женщин с высоким риском развития ПЭ с физиологическим течением беременности и родивших доношенных детей; 3) 10 женщин с высоким риском развития ПЭ и манифестацией ПЭ на сроке 34–37 недель; 4) 11 женщин с высоким риском развития ПЭ и манифестацией ПЭ на сроке 25–33 недели.

Во вторую когорту пациенток вошли 27 беременных в возрасте 25–38 лет, родоразрешенных путем кесарева сечения и сформировавших четыре группы (табл. 2): 1) шесть женщин с доношенной физиологической беременностью (37–39 недель); 2) семь женщин с предлежанием плаценты и преждевременным излитием околоплодных вод на сроке 25–31 неделя гестации без

**Таблица 1.** Клинические характеристики групп беременных женщин первой когорты, прошедших скрининг первого триместра беременности

	Норма, N (n = 10)	Норма с высоким риском развития ПЭ, Nhr (n = 9)	Поздняя преэклампсия, пПЭ (n = 10),	Ранняя преэклампсия, рПЭ (n = 11),
	Скрининг первого триместра беременности			
Срок беременности	12,5 (12,0; 13,4)	12,1 (11,2; 13,1)	12,2 (11,6; 12,5)	12,0 (11,2; 12,4)
КТР (43,0–84,0 мм)	62,5 (54,0; 74,7)	59,1 (50,0; 69,0)	59,6 (55,1; 64,0)	57,4 (50,0; 62,0)
ТВП (1,6–1,7 мм)	1,4 (1,1; 2,2)	1,5 (1,0; 2,0)	1,6 (1,3; 2,0)	1,7 (1,1; 2,9)
МА (ПИ), 0,9–2,6 (5-й и 95-й процентиля)	1,6 (0,4; 2,2)	1,8 (1,2; 2,5)	1,7 (0,7; 2,4)	2,1 (1,3; 3,5)
МА (ПИ) МоМ	0,9 (0,3; 1,3)	1,1 (0,8; 1,4)	1,0 (0,4; 1,5)	1,1 (0,3; 2,1)
b-ХГЧ (50,0–55,0 МЕ/мл)	68,7 (52,3; 89,8)	47,1 (23,1; 114,6)	36,4 (27,8; 53,6)	43,4 (15,6; 94,3)
b-ХГЧ (0,5–2,0 МоМ)	1,5 (1,1; 2,3)	1,1 (0,4; 2,5)	0,8 (0,5; 1,6)	0,9 (0,3; 1,7)
PAPP-A (0,7–6,0 МЕ/л)	3,1 (1,6; 6,9)	2,4 (1,1; 4,2)	2,7 (0,6; 5,0)	2,4 (0,8; 6,2)
PAPP-A (0,5–2,0 МоМ)	1,2 (0,5; 3,2)	1,2 (0,4; 2,4)	0,9 (0,4; 2,7)	1,1 (0,5; 2,9)
Родоразрешение				
Срок беременности	38,6 (36,0; 40,6)	37,7 (31,0; 40,2)	37,3 (35,4; 38,5)	31,9 (28,2; 35,6)
АЛТ (до 31,0 Ед/л)	31,8 (8,8; 95,0)	24,1 (11,8; 46,1)	34,2 (12,4; 165,1)	78,2 (11,8; 352,2)
АСТ (до 31,0 Ед/л)	19,7 (11,1; 25,5)	24,3 (13,0; 40,5)	48,9 (10,9; 262,3)	68,7 (13,6; 282,4)
Щелочная фосфатаза (до 239,0 ед/л)	182,3 (130,8; 292,6)	130,2 (94,2; 183,0)	208,8 (154,3; 319,6)	119,8 (87,1; 169,2)
ЛДГ (130,0–220,0 Ед/л)	345,6 (271,0; 408,2)	362,2 (296,8; 422,2)	435,8 (36,4; 743,1)	598,7 (351,4; 1680,0)
АД систолическое (от 20 до 40 лет: 120–127 мм рт. ст.)	118 (90; 140)	135 (105; 170)	140 (127; 160)	152 (140; 170)
АД диастолическое (75–80 мм рт. ст.)	77 (60; 90)	86 (70; 110)	91 (80; 105)	98 (90; 110)
Уровень белка в моче (0,0–0,2, г/л)	0,1 (0,1; 0,1)	0,1 (0,0; 0,1)	0,4 (0,2; 0,9)	2,1 (0,2; 3,4)
Лейкоциты периферической крови (4,0–9,0 тыс/мм <sup>3</sup> )	9,5 (5,2; 15,6)	8,8 (7,8; 10,5)	10,8 (7,7; 24,4)	11,5 (3,3; 23,2)
Тромбоциты периферической крови (150–390 тыс/мм <sup>3</sup> )	261,8 (201,0; 390,0)	209,9 (146,0; 287,0)	210,1 (93,0; 300,0)	203,5 (82,0; 359,0)
PLGF (250–1200 пг/мл)	115,3 (94,4; 143,8)	74,9 (43,2; 113,4)	83,6 (34,2; 152,0)	56,8 (22,2; 109,7)
sFLT-1 (950–2800 пг/мл)	6271,0 (5168,0; 7763,0)	11895,6 (5190,0; 19418,0)	9651,7 (4027,0; 14131,0)	10722,8 (5216,0; 19738,0)
sFLT-1/ PLGF	54,4 (53,9; 54,8)	173,4 (107,3; 430,1)	129,4 (66,8; 233,6)	285,4 (48,8; 636,2)
Наличие отеков голеней и стоп (число человек)	3	1	4	5
Масса доношенного плода, 3200–3500 г	3396,5 (2880,0; 3952,0)	2764,4 (780,0; 3550,0)	2744,9 (2132,0; 3518,0)	1424,2 (900,0; 2582,0)
Масса плаценты при доношенной беременности, 390–415 г	463,1 (303,0; 650,0)	324,4 (106,0; 449,0)	370,3 (257,0; 465,0)	230,2 (119,0; 371,0)
Среднее значение ПИ маточной артерии (39-я неделя, 5-й и 95-й перцентили: 0,47–0,91)	0,6 (0,5; 0,7)	0,8 (0,5; 1,7)	0,9 (0,6; 1,1)	1,2 (1,0; 1,5)
ПИ артерии пуповины (39-я неделя, 5-й и 95-й перцентили: 0,76–1,03)	0,8 (0,6; 1,4)	1,1 (0,7; 2,3)	0,9 (0,7; 1,0)	1,4 (0,8; 1,8)
ПИ среднечеребной артерии (39-я неделя, 5-й и 95-й перцентили: 0,93–1,73)	1,4 (1,2; 1,7)	1,4 (1,2; 1,6)	1,3 (0,6; 1,7)	1,6 (1,1; 2,4)
Церебро-плацентарное отношение, > 1	1,8 (1,1; 2,5)	1,4 (0,6; 2,0)	1,5 (1,1; 2,3)	1,3 (0,8; 1,9)

**Примечание:** все данные, за исключением «наличие отеков голеней и стоп», представлены в виде среднего значения (минимум; максимум).

Таблица 2. Клинические характеристики групп беременных женщин второй когорты с физиологической и осложненной беременностью

	Женщины с физиологически протекающей беременностью	Женщины с осложненной беременностью		
Родоразрешение	Плановое кесарево сечение	Экстренное кесарево сечение в связи с отсутствием возможности пролонгирования беременности	Кесарево сечение в связи с ранней преэклампсией	Плановое кесарево сечение в связи с поздней преэклампсией
Группа беременных женщин (число человек)	I (6), $n > 34$	II (7), $n < 34$	III (7), рПЭ	IV (7), пПЭ
Манифестация преэклампсии (недели)	Отсутствует	Отсутствует	24,5 (22,0; 28,0)*	36,1 (36,0; 37,0)*
Срок родоразрешения (недели)	38,0 (37,0; 39,0)*	29,0 (25,0; 32,0)*	28,2 (25,0; 30,0)*	36,9 (36,0; 38,0)*
Наличие тяжелой формы преэклампсии (число человек)	0	0	7	1
Наличие умеренной формы преэклампсии (число человек)	0	0	0	6
Наличие отеков голеней и стоп (число человек)	0	0	1	5
Уровень белка в моче (0,0–0,2 г/л)	Норма	Норма	2,3 (0,2; 4,6)*	1,4 (0,1; 4,1)*
Давление крови – систолическое – диастолическое	112 (107; 119)* 68 (65; 71)*	116 (112; 120)* 77 (74; 81)*	155 (125; 180)* 100 (80; 120)*	144 (120; 175)* 93 (70; 100)*
АЛТ (до 31 Ед/л)	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют	74 (11; 215)*	23 (12; 32)*
АСТ (до 31 Ед/л)	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют	55 (11; 194)*	29 (16; 48)*
Щелочная фосфатаза (до 239 ед/л)	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют	110 (54; 179)*	165 (79; 252)*
Тромбоциты периферической крови (150–390 тыс/мм <sup>3</sup> )	228 (166; 290)*	238 (183; 293)*	145 (68; 243)*	238 (181; 308)*
PLGF (250–1200 пг/мл)	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют	30 (14; 47)*	101 (54; 216)*
sFLT-1 (950–2800 пг/мл)	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют	11957 (5615; 23226)*	14657 (7489; 24990)*
sFLT-1/ PLGF	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют	444 (126; 847)*	193 (42; 348)*

Примечание: \* — данные представлены в виде среднего значения (минимум; максимум) на момент поступления в стационар.

клинических проявлений преэклампсии; 3) семь женщин с ранней преэклампсией (25–30 недель); 4) семь женщин с поздней преэклампсией (36–38 недель).

Критерии не включения в исследование обеих когорт пациенток: наступление беременности с помощью вспомогательных репродуктивных технологий, многоплодная беременность, отягощенный соматический анамнез беременной женщины, анеуплоидии плода. Методы исследования включали: клинический и биохимический анализы крови, УЗИ органов малого таза и плода, доплерометрию фето-плацентарного кровотока, кардиотокографию, измерение артериального давления, определение уровня белка в моче, определение концентрации PLGF, sFlt-1, PAPP,  $\beta$ -ХГЧ в сыворотке крови с помощью диагностических тест-систем.

Сыворотку крови (800 мкл) каждой пациентки из первой когорты центрифугировали 10 мин при 300 g при 4 °C и надосадочную жидкость повторно центрифугировали 10 мин при 3000 g при 4 °C — для очистки от примесей форменных элементов крови. Очищенную сыворотку (200 из 700 мкл) использовали для выделения РНК набором miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen; Германия) с предварительным добавлением  $5,6 \times 10^8$  копий синтетической РНК cel-miR-39 (Qiagen; Германия) после инкубации сыворотки с фенольной

смесью Qiazol для контроля эффективности выделения РНК и синтеза кДНК в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Элюат РНК в объеме 7 мкл использовали в обратной транскрипции набором miScript II RT Kit (Qiagen; Германия) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Синтезированная кДНК (2 мкл) служила в качестве матрицы для ПЦР-анализа в реальном времени с использованием смыслового праймера, специфичного для исследуемой мкРНК (miR-320a-3p, MIMAT0000510, 5'-aaaagctgggtgagagggcga, температура отжига с матрицей — 59,5 °C; miR-17-5p, MIMAT0000070, 5'-caaagtgcttacagtcgagtag, 55 °C; miR-25-3p, MIMAT0000081, 5'-cattgcactgtctcggctctga, 56 °C; miR-92a-3p, MIMAT0000092, tattgcactgtcccgccctgt, 60 °C), cel-miR-39 (miScript Primer Assay, Ce\_miR-39\_1, 55 °C; Qiagen; Германия), и набора miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen; Германия), содержащего универсальный праймер miScript Universal Primer (антисмысловый) и ПЦР-смесь SYBR Green PCR MasterMix. Условия реакции ПЦР: 15 мин при 95 °C с последующим проведением 40 циклов (15 с — при 94 °C, 30 с — при температуре отжига праймера и 30 с — при 70 °C) в амплификаторе StepOnePlus™ (Applied Biosystems; США). Относительный уровень экспрессии кДНК оценивали методом  $\Delta\Delta C_t$ , где  $\Delta C_t = (C_t)_{si} - (C_t)_{ri}$ , где  $(C_t)_{si}$  — значение порогового цикла

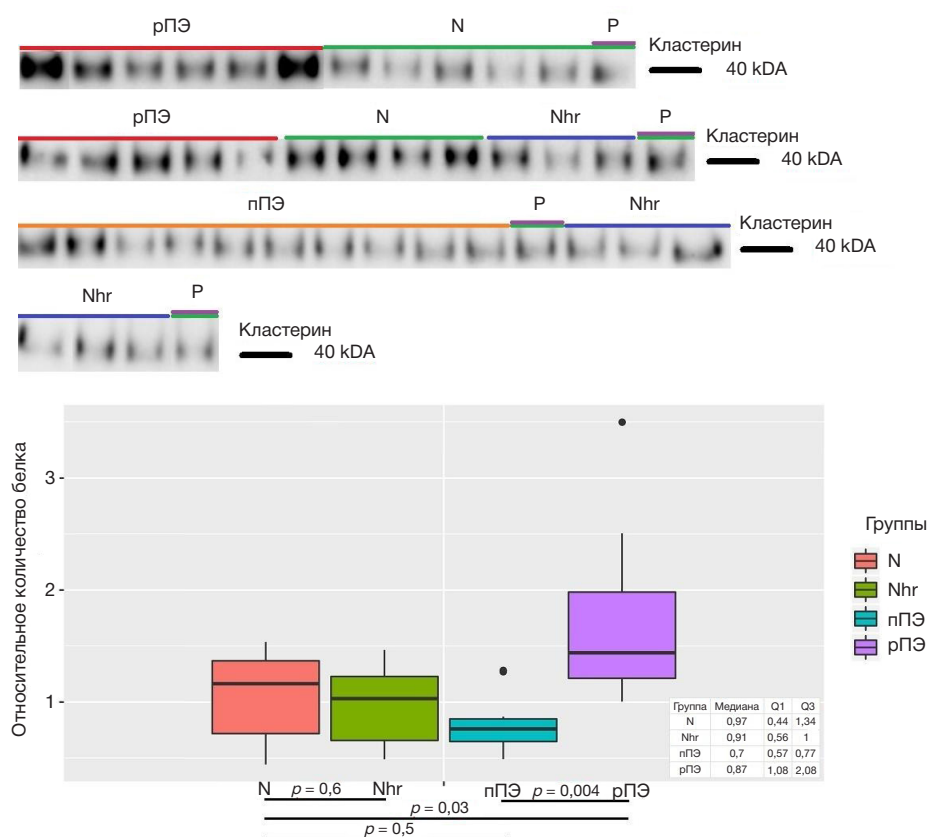


Рис. 1. Вестерн-блоттинг кластерина в везикулярной фракции сыворотки крови пациенток первой когорты на 12-й неделе беременности

амплификации кДНК анализируемой мкРНК в образце; (Ct)ri — значение порогового цикла амплификации кДНК референсной РНК cel-miR-39 в образце.

Оставшиеся 500 мкл очищенной сыворотки крови пациенток первой когорты были использованы для выделения микровезикул набором miRCURY Exosome Kits (Qiagen; Германия) с добавлением 200 мкл преципитирующего раствора и 14-часовой инкубацией при 4 °C — с последующим центрифугированием при 1500 g в течение 30 мин при 20 °C. Супернатант отбирали в чистую пробирку, и в конечном его разведении в 100 раз при добавлении Laemmli буфера (#1610737, BioRad; США) с 5% (v/v) 2-меркаптоэтанолом (Am-O482-0.1, VWR Life Science AMRESCO; США) использовали для анализа Вестерн-блоттингом. К осадку, содержащему везикулы, добавляли 270 мкл ресуспендирующего буфера, и в конечном разведении везикул в 1000 раз при добавлении Laemmli буфера (#1610737, BioRad; США) с 5% (v/v) 2-меркаптоэтанолом (Am-O482-0.1, VWR Life Science AMRESCO; США) образец использовали для анализа Вестерн-блоттингом.

Образцы ткани плаценты, взятые для исследования не позднее 10 мин после родоразрешения пациенток второй когорты, представляли собой тканевой срез толщиной 5 мм, проходящий через всю толщу плаценты и охватывающий плодную и материнскую части плаценты целиком от хориальной пластинки до децидуальной оболочки. Взятый образец ткани плаценты промывали в 0,9%-м NaCl и мгновенно замораживали в жидком азоте для последующего хранения при –80 °C. Ткань измельчали до порошковой консистенции в парах жидкого азота и 10 мг ткани лизировали в буфере RIPA Lysis Buffer System (sc-24948, Santa Cruz; США). После инкубации во льду в течение 30 мин и центрифугирования лизата при 10 000 g

измеряли концентрацию растворимой фракции белка биуретовым методом в спектрофотометре NanoDrop One (ThermoScientific; США). Для последующего анализа методом Вестерн-блоттинга брали 40 мкг белка из каждого образца.

Для количественной оценки уровня альфа-субъединицы секреторной формы кластерина в сыворотке периферической крови (первая когорта пациенток) и плаценте (вторая когорта пациенток) применяли метод Вестерн-блоттинга. Перед фракционированием в разделяющем 10%-м полиакриламидном геле в гидроксиметиламинометантрициновом буфере (100 mM гидроксиметиламинометан, 100 mM трицин, 0,1%-й додецилсульфат натрия) образцы были денатурированы при 70 °C в течение 10 мин в буфере Laemmli sample buffer (#1610737, BioRad; США), содержащем 5% (v/v) 2-меркаптоэтанол (Am-O482-0.1, VWR Life Science AMRESCO; США). С целью определения молекулярной массы анализируемого белка в лунку каждого ПААГ вносили маркер молекулярных весов белков PageRuler, 10–250 кДа (#26619, Thermo Fisher Scientific; США). По окончании электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 μm, BioRad; США) методом полусухого переноса с использованием 10 mM 3-циклогексиламино-1-пропансульфоновой кислоты (SW18805, Sigma-Aldrich; США), pH 10,5, 10% этанола. После блокировки мембраны в 5%-м обезжиренном молоке (Blotting-Grade Blocker, #1706404, BioRad; США), 0,1% Tween20 (#1706531, BioRad; США), 50 mM Tris (T4661, Sigma; США), pH 7,5, 150 mM NaCl (A1371, AppliChem Panreac ITW Companies; Германия) в течение 2 ч, проводили инкубацию в течение 1 ч с первичными антителами к альфа-субъединице кластерина в разведении 1 : 400 (B-5, sc-5289, Santa Cruz Biotechnology; США) или к актину в разведении 1 : 400

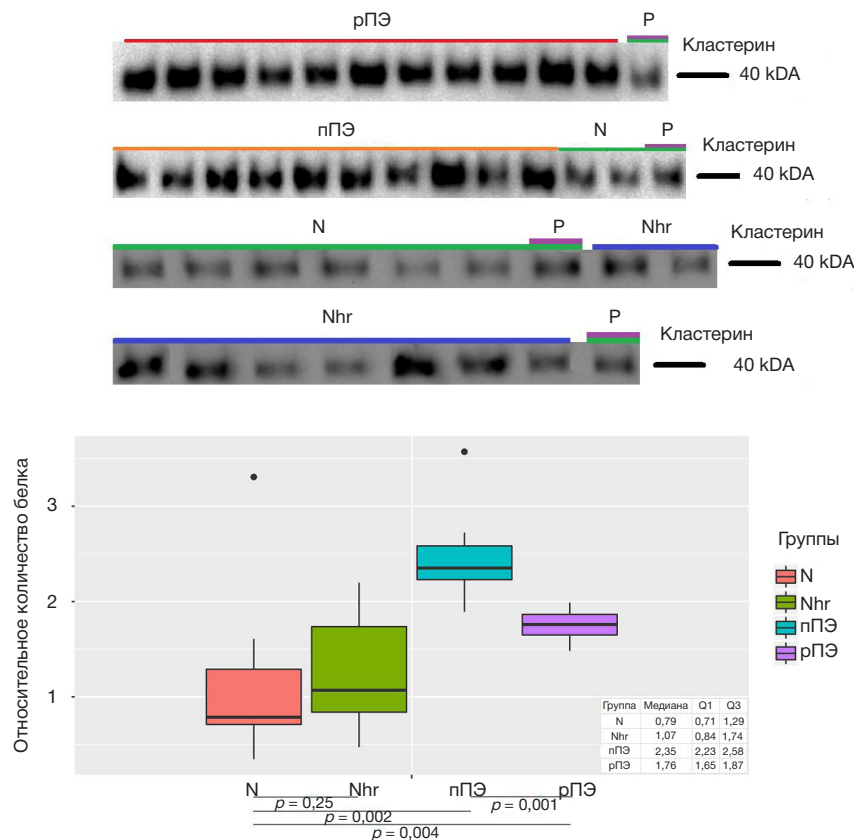


Рис. 2. Вестерн-блоттинг кластерина в свободной от везикул фракции сыворотки крови пациенток первой когорты на 12-й неделе беременности

(H-6, sc-376421, Santa Cruz Biotechnology; США) в 5%-м обезжиренном молоке, 0,1% Tween20, 50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, трехкратной промывкой мембраны в течение 5 мин в 0,05% Tween20, 50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl с последующей инкубацией в течение часа со вторичными поликлональными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в разведении 1 : 2000 (HAF007, R&D Systems; США) в 1%-м обезжиренном молоке, 0,1% Tween20, 50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl. После трехкратной промывки мембраны в течение 5 мин в 0,05% Tween20, 50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl активность пероксидазы измеряли путем добавления хемилюминисцентного субстрата Clarity Max™ Western ECL Substrate (#1705062, BioRad; США) и детекции хемилюминисценции в системе гель-документирования ChemiDoc MP (#12003154, BioRad; США).

### Статистический анализ данных

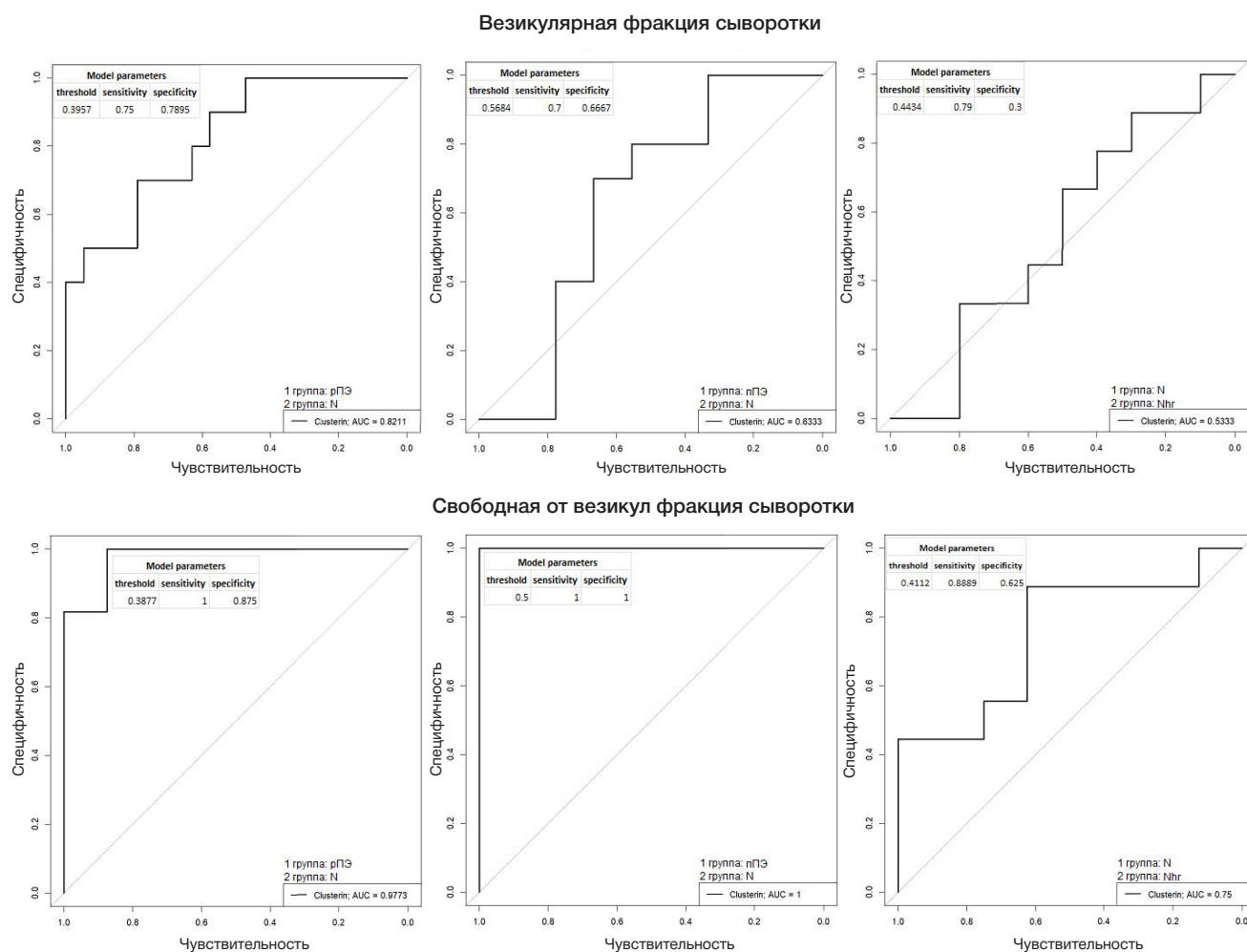
Статистическую обработку данных выполняли с помощью таблиц Microsoft Excel и программы RStudio (Posit; США). Статистический анализ проводили с помощью теста Манна–Уитни при парном сравнении в случае, когда распределение не соответствовало закону нормального распределения. При распределении признаков, отличающемся от нормального, их описывали в виде медианы (Me) и квартилей  $Q_1$  и  $Q_3$  в формате Me ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ). Величину порогового уровня значимости  $p$  принимали равной 0,05. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Для оценки возможности классификации пациентов по группам на основании полученных данных разрабатывали модели логистической регрессии, качество которых оценивали с помощью ROC-анализа, а также расчета чувствительности и специфичности.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Анализ содержания секреторной формы кластерина в сыворотке крови пациенток первой когорты

На первом этапе исследования ретроспективно была проведена количественная оценка секреторной формы кластерина в сыворотке крови пациенток в среднем на 12-й неделе беременности методом Вестерн-блоттинга с использованием первичных антител к альфа-субъединице белка. В зависимости от исхода беременности пациентки первой когорты (табл. 1) были разделены на четыре группы (см. «Пациенты и методы»). Используемый набор MIRCURY exosome kit (Qiagen; Германия), основанный на преципитации в присутствии полиэтиленгликоля, позволил получить две фракции сыворотки крови беременных: везикулярную фракцию, в состав которой вошли микровезикулы, экзосомы, апоптотические тельца, и свободную от везикул фракцию (супернатант). Результаты анализа везикулярной фракции сыворотки крови представлены на рис. 1. В верхней части изображения показаны блоты с хемилюминисцентными полосами, соответствующими альфа-субъединице кластерина массой 40 кДа, в образцах норм (N) с низким риском развития ПЭ по данным программы Astraia, в образцах норм (Nhr) с высоким риском развития ПЭ, а также в образцах беременных, у которых впоследствии проявились симптомы рПЭ или пПЭ. С целью учета эффективности переноса белков из геля на мембрану и различий в экспозиции при формировании изображения в гель-документирующей системе в одну из лунок каждого геля наносили один и тот же референсный образец (P) из группы норм (N), с которым сопоставляли значения хемилюминисценции в каждом образце. Выявлено статистически значимое





**Рис. 3.** Модели логистической регрессии прогнозирования развития рПЭ и пПЭ по уровню секреторной формы кластерина в везикулярной и свободной от везикул фракции сыворотки пациенток на 12-й неделе беременности

двукратное повышение уровня секреторного кластерина в везикулярной фракции сыворотки крови пациенток первого триместра беременности, у которых в дальнейшем развились клинические проявления ранней ПЭ, в сравнении с образцами N ( $p = 0,03$ ), как указано на бокс-диаграмме (рис. 1). Статистически значимых отличий группы пПЭ от группы N по уровню секреторного кластерина в везикулярной фракции выявлено не было.

Методом ранговой корреляции Спирмена была обнаружена обратная корреляция уровня секреторного кластерина в везикулярной фракции сыворотки крови женщин и КТР ( $r = -0,31$ ;  $p = 0,052$ ), а также прямая корреляция уровня данной фракции кластерина и значения  $\beta$ -ХГЧ сыворотки крови женщин ( $r = 0,28$ ;  $p = 0,082$ ) на 12-й неделе беременности.

Результаты анализа уровня альфа-субъединицы секреторного кластерина в свободной от везикул фракции сыворотки крови методом Вестерн-блоттинга представлены на рис. 2. Выявлено статистически значимое повышение уровня секреторного кластерина (40 кДа) во вневезикулярной фракции сыворотки крови пациенток первого триместра беременности, у которых в дальнейшем развились клинические проявления рПЭ (увеличение в 2,2 раза) или пПЭ (увеличение в 3 раза), в сравнении с образцами N ( $p = 0,004$  и  $p = 0,002$  соответственно), как указано на бокс-диаграмме (рис. 2). При этом в случае пПЭ уровень кластерина во вневезикулярной фракции оказался в 1,5 раза выше такового при рПЭ ( $p < 0,001$ ).

Статистически значимых различий группы Nhr и группы N по уровню секреторного кластерина в везикулярной и вневезикулярной фракции сыворотки крови выявлено не было (рис. 1 и рис. 2).

Методом ранговой корреляции Спирмена была обнаружена обратная корреляция уровня секреторного кластерина во вневезикулярной фракции сыворотки крови женщин и  $\beta$ -ХГЧ MoM ( $r = -0,3$ ;  $p = 0,0627$ ).

#### **Количественная оценка miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-320a и miR-17-5p в сыворотке крови пациенток первой когорты**

Согласно четырем электронным базам данных miRWalk, miRanda, RNA22 и Targetscan, потенциальными регуляторами уровня экспрессии кластерина являются мкРНК miR-320a, miR-30a-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-30c-5p, miR-1323, miR-25-3p, miR-138-5p, miR-34a-5p, miR-92a-3p. В исследовании по анализу взаимосвязей между уровнями кластерина и регулируемыми его мкРНК при вращении плаценты [24] нами выявлены статистически значимые обратные корреляции содержания секреторного кластерина в плазме периферической крови беременных со значениями « $-\Delta Ct$ » miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-320a, miR-17-5p на момент родоразрешения. В связи с тем что трофобластные клетки при вращении плаценты и преэклампсии имеют прямо противоположные инвазивные свойства, нам представлялось интересным проследить за

возможными взаимосвязями данных мкРНК и кластерина в сыворотке крови пациенток первой когорты на 11–14-й неделе беременности. Методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени были получены значения относительного содержания miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-320a, miR-17-5p в сыворотке беременных в виде значений «-ΔCt» (см. «Пациенты и методы»). Методом ранговой корреляции Спирмена была обнаружена статистически значимая положительная корреляция содержания секреторной формы кластерина во вневезикулярной фракции сыворотки крови беременных и значением «-ΔCt» miR-17-5p ( $r = 0,34$ ;  $p = 0,0356$ ) сыворотки крови. Надо отметить, что, согласно базе данных miRTargetLink 2.0 (<https://ccb-compute.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink2/network/a7aa6e41-7676-4e3b-875c-43c926dedae5>), кластерин является экспериментально доказанной мишенью miR-17-5p.

Методом ранговой корреляции Спирмена выявлены статистически значимые положительные корреляции «-ΔCt» miR-16-5p сыворотки крови и индексом пульсации маточных артерий (МА (ПИ):  $r = 0,37$ ,  $p = 0,021$ ; МА (ПИ) MoM:  $r = 0,32$ ,  $p = 0,046$ ). В свою очередь выявлены обратные взаимосвязи между индексом пульсации маточных артерий и ассоциированного с беременностью белка А плазмы (МА (ПИ) и RAPP-A:  $r = -0,41$ ;  $p = 0,01$ ; МА (ПИ) MoM и RAPP-A MoM:  $r = -0,35$ ,  $p = 0,0296$ ).

#### Оценка вероятности развития ранней и поздней ПЭ по уровню секреторного кластерина в двух фракциях (везикулярной и вневезикулярной) сыворотки крови женщин в первом триместре беременности

На основании полученных в работе значений содержания секреторного кластерина в сыворотке крови женщин первой когорты (табл. 1), проходящих скрининговое исследование в первом триместре беременности, были построены модели логистической регрессии расчета вероятности развития ранней и поздней ПЭ (рис. 3).

Выявлено, что наилучшей прогностической точностью с высокой специфичностью и чувствительностью обладают модели оценки вероятности возникновения клинических проявлений рПЭ и пПЭ после 20-й недели беременности по уровню секреторного кластерина в свободной от везикул фракции сыворотки крови пациенток, а не в везикулярной фракции, на 11–14-й неделях беременности. Формулы расчета вероятности развития ранней ПЭ (формула 1) и поздней ПЭ (формула 2) представлены ниже:

$$\frac{1}{1 + e^{15,71 - 10,9x}}, \quad (1)$$

$$\frac{1}{1 + e^{267,11 - 152,58x}}. \quad (2)$$

#### Анализ содержания секреторной формы кластерина в ткани плаценты пациенток второй когорты на момент родоразрешения

С целью идентификации секреторного кластерина в ткани плаценты от женщин с рПЭ и пПЭ в сравнении с группами соответствующего срока гестации ( $N < 34$  недель,  $N > 34$  недель) без признаков ПЭ была проанализирована вторая когорта пациенток (табл. 2). Полученные для кластерина данные хемилюминисценции были соотнесены с хемилюминисцентным сигналом от актина в одном и том же образце. Выявлено статистически значимое снижение уровня секреторного кластерина молекулярной массой

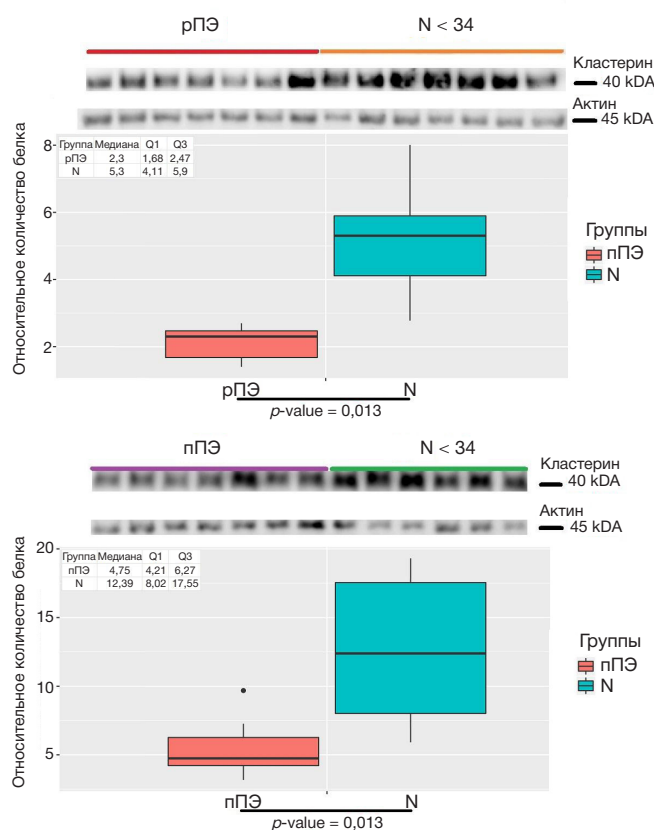


Рис. 4. Вестерн-блоттинг кластерина в плацентарной ткани на момент родоразрешения при рПЭ и пПЭ. На бокс-диаграммах представлено отношение количества кластерина к актину

40 кДа в плаценте при ПЭ относительно нормы: в 2,3 раза в случае рПЭ ( $p = 0,001$ ) и в 2,6 раза в случае пПЭ ( $p = 0,013$ ), как указано на бокс-диаграмме (рис. 4).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании мы решили сфокусировать свое внимание на количественной оценке секреторного кластерина в сыворотке крови женщин на 11–14-й неделе беременности с целью выявления возможных различий патогенеза рПЭ и пПЭ, что могло бы лечь в основу построения математических моделей прогнозирования данных осложнений беременности в первом триместре до начала клинических проявлений ПЭ.

Мы обнаружили статистически значимое повышение уровня секреторного кластерина (40 кДа) во вневезикулярной фракции сыворотки крови пациенток в первом триместре беременности при дальнейшем возникновении как рПЭ, так и пПЭ относительно группы женщин с физиологической беременностью (двукратное и трехкратное увеличение соответственно). Несмотря на более выраженное увеличение уровня секреции кластерина в случае пПЭ в сравнении с рПЭ, общее количество секреторного кластерина, циркулирующего в сыворотке крови при рПЭ, намного больше такового при пПЭ за счет везикулярной фракции, где уровень кластерина в 2,7 раза выше при рПЭ в сравнении с пПЭ. Более того, поскольку в анализ методом Вестерн-блоттинга было взято везикулярной фракции сыворотки крови в 10 раз больше, чем вневезикулярной фракции, то можно сделать вывод о большей функциональной значимости кластерина в составе циркулирующих в крови внеклеточных везикул при рПЭ в сравнении с пПЭ.

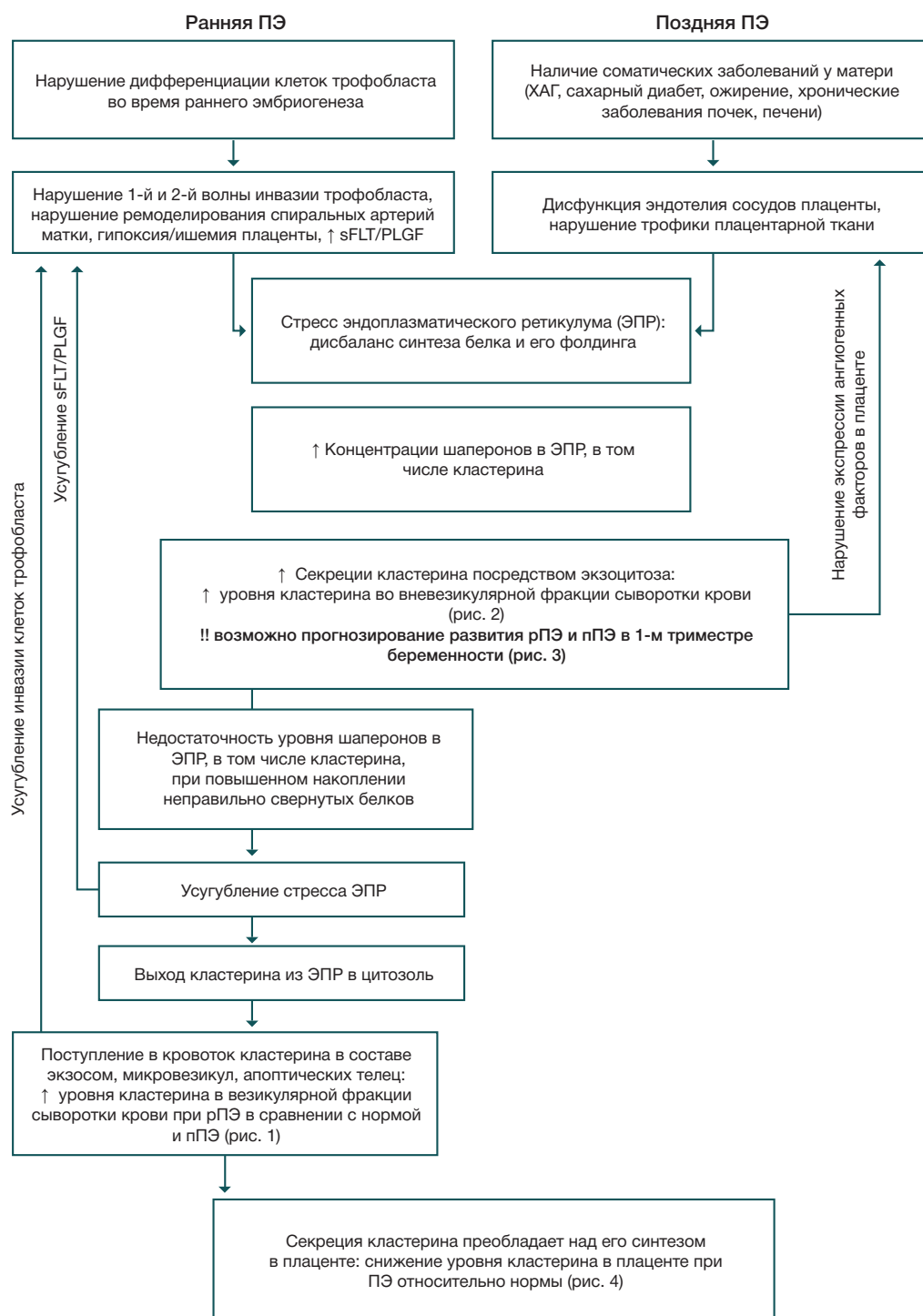


Рис. 5. Схематичное представление роли секреторного кластерина в патогенезе ранней и поздней ПЭ

Полученные в настоящей работе данные о повышении уровня кластерина в периферической крови беременных с ПЭ согласуются с результатами работы, где методом полуколичественной нано-ЖХ-МС выявлено статистически значимое повышение уровня кластерина в сыворотке крови женщин на 10–20-й неделе беременности с последующим развитием гипертензивных расстройств после 20-й недели беременности [29]. Но в указанной работе не были проанализированы беременные с рПЭ, а были взяты в исследование беременные с пПЭ и гипертензивными расстройствами без протеинурии. В других работах при анализе плазмы крови беременных на момент родоразрешения было выявлено статистически

значимое повышение уровня кластерина в группе женщин с ПЭ относительно группы женщин с физиологической беременностью [30, 31], причем беременные с ПЭ в сочетании с задержкой роста плода имели более значимое повышение уровня кластерина нежели беременные с ПЭ с нормальными фетометрическими показателями [31]. Индукция синтеза кластерина при ПЭ может быть обусловлена наличием в промоторной области кодирующего его гена участков связывания таких факторов, как SP1, NF1, AP-1, HSF1, YB-1, p53, B-MYB, уровень которых в условиях окислительного стресса, гипоксии и апоптоза резко повышается [32–35]. В свою очередь, кластерин регулирует активность фактора транскрипции

NF-κB, который играет важную роль в жизнеспособности клеток, их подвижности, пролиферации, фенотипической трансформации и воспалении [36]. Кроме того, уровень экспрессии кластерина, как и любого другого белка, может регулироваться на посттранскрипционном уровне активностью микроРНК. В данной работе при количественной оценке потенциальных регуляторов экспрессии кластерина (miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-320a-3p и miR-17-5p) в сыворотке крови женщин в первом триместре беременности выявлена статистически значимая корреляция содержания секреторной формы кластерина во вневезикулярной фракции сыворотки крови беременных и значением «-ΔCt» miR-17-5p. В одной из статей подробно описано участие miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-320a-3p и miR-17-5p в индукции эпителиально-мезенхимального перехода [37]. Возможно, участие данных микроРНК в фенотипической трансформации клеток вневорсинчатого трофобласта и последующего ремоделирования стенки маточных артерий отражается в обнаруженной нами положительной корреляции «-ΔCt» miR-16-5p сыворотки крови беременных и индексом пульсации маточных артерий (МА (ПИ):  $r = 0,37$ ,  $p = 0,021$ ; МА (ПИ) МоМ:  $r = 0,32$ ,  $p = 0,046$ ), значения которого обратно коррелировали с уровнем ассоциированного с беременностью белка А плазмы (МА (ПИ) и RAPP-A:  $r = -0,41$ ,  $p = 0,01$ ; МА (ПИ) МоМ и RAPP-A МоМ:  $r = -0,35$ ,  $p = 0,0296$ ).

Поскольку в клетках эукариот существует три формы кластерина (ядерная, секреторная и цитозольная) [25], нам представлялось интересным проанализировать возможные различия рПЭ и пПЭ по уровню секреторной формы кластерина (40 кДа) в ткани плаценты на момент родоразрешения в сравнении с образцами плацент от пациенток без признаков ПЭ соответствующего срока гестации. Мы выявили статистически значимое двукратное снижение уровня экспрессии кластерина в ткани плаценты беременных с рПЭ и пПЭ. Возможно, сниженный уровень экспрессии секреторной формы кластерина в плаценте при ПЭ обусловлен чрезмерным уровнем его секреции, что мы наблюдали в настоящей работе уже в первом триместре беременности у женщин с развившейся впоследствии ПЭ. Другой причиной может быть повышенное поступление секреторного кластерина из плаценты в материнскую кровь при ПЭ в связи с характерным для данного осложнения беременностью окислительным стрессом и гипоксическими/ишемическими процессами в ткани плаценты, что сопровождается поступлением кластерина сначала из ЭПР в цитозоль [38–40], а затем в материнский

кровоток в составе микровезикул и экзосом, или в составе апоптотических телец при выраженном стрессе ЭПР в синцитиотрофобласте и цитотрофобласте [1]. Выявлено, что окислительный стресс и активация маркеров стресса ЭПР, равно как и выброс в кровоток плацентарных микровезикул, более выражены при рПЭ, чем при пПЭ [22, 41]. При этом концентрация экзосом в сыворотке крови беременных увеличивается только при рПЭ, но не при пПЭ [42]. В настоящем исследовании мы обнаружили, что именно при рПЭ статистически значимо увеличен уровень кластерина в составе везикул при отсутствии значимых изменений кластерина в везикулярной фракции сыворотки при пПЭ. При этом доказано, что секреторный кластерин в сыворотке крови беременных может оказывать негативное влияние на пролиферацию, инвазию и выживаемость самих клеток трофобласта [27, 29], формируя положительную обратную связь: «стресс ЭПР клеток синцитиотрофобласта — увеличение внефобластного кластерина — усугубление стресса ЭПР клеток синцитиотрофобласта и апоптотических/некротических процессов в них — пополнение фракции внефобластного кластерина в материнском кровотоке».

Поскольку для двух видов ПЭ (ранней и поздней) статистически значимые изменения уровня секреторного кластерина были обнаружены во вневезикулярной фракции сыворотки крови женщин в первом триместре беременности в сравнении с физиологической беременностью, именно эту фракцию целесообразно использовать для прогнозирования развития ПЭ на этапе первого скрининга беременности, ориентируясь на разработанные в настоящем исследовании модели логистической регрессии.

## Выводы

В рамках настоящего исследования построены модели логистической регрессии по уровню секреторного кластерина, позволяющие прогнозировать раннюю и позднюю ПЭ задолго до начала клинических проявлений данных осложнений беременности. Но для внедрения построенных математических моделей в клиническую практику необходима проверка полученных данных на более широкой выборке. Уточнены новые патогенетические механизмы развития ранней и поздней ПЭ на основании количественного анализа секреторного кластерина в двух фракциях (везикулярной и вневезикулярной) сыворотки крови женщин в первом триместре беременности и в ткани плаценты на момент родоразрешения (рис. 5).

## Литература

1. Burton GJ, Redman CW, Roberts JM, Moffett A. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. *BMJ*. 2019; 366: 12381. DOI: 10.1136/bmj.12381.
2. Ananth CV, Lavery JA, Friedman AM, Wapner RJ, Wright JD. Serious maternal complications in relation to severe pre-eclampsia: a retrospective cohort study of the impact of hospital volume. *BJOG*. 2017; 124: 1246–53. DOI: 10.1111/1471-0528.14384.
3. Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, et al. The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens*. 2018; 13: 291–310. DOI: 10.1016/j.preghy.2018.05.004.
4. Pierrat V, Marchand-Martin L, Arnaud C, Kaminski M, Resche-Rigon M, Lebeaux C, et al. Neurodevelopmental outcome at 2 years for preterm children born at 22 to 34 weeks' gestation in France in 2011: EPIPAGE-2 cohort study. *BMJ*. 2017; 358: j3448. DOI: 10.1136/bmj.3448.
5. Van Beek PE, Rijken M, Broeders L, Ter Horst HJ, Koopman-Esseboom C, de Kort E, et al. Two-year neurodevelopmental outcome in children born extremely preterm: the EPI-DAF study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2022; 107: 467–74. DOI: 10.1136/archdischild-2021-323124.
6. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertens*. (Dallas, Tex. 1979). 2008; 51: 970–75. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107607.
7. Garrido-Gomez T, Dominguez F, Quiñero A, Diaz-Gimeno P,



- Kapidzic M, Gormley M, et al. Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114: E8468–E8477. DOI: 10.1073/pnas.1706546114.
8. Ruane PT, Berneau SC, Koeck R, Watts J, Kimber SJ, Brison DR, et al. Apposition to endometrial epithelial cells activates mouse blastocysts for implantation. *Mol Hum Reprod*. 2017; 23: 617–27. DOI: 10.1093/molehr/gax043.
  9. Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*. 2010; 31 Suppl: S66–9. DOI: 10.1016/j.placenta.2009.12.021.
  10. Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta*. 1983; 4: 397–413. DOI: 10.1016/s0143-4004(83)80043-5.
  11. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JCP. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*. 2009; 30: 473–82. DOI: 10.1016/j.placenta.2009.02.009.
  12. James JL, Saghian R, Perwick R, Clark AR. Trophoblast plugs: impact on utero-placental haemodynamics and spiral artery remodelling. *Hum Reprod*. 2018; 33: 1430–41. DOI: 10.1093/humrep/dey225.
  13. Allerkamp HH, Clark AR, Lee TC, Morgan TK, Burton GJ, James JL. Something old, something new: digital quantification of uterine vascular remodelling and trophoblast plugging in historical collections provides new insight into adaptation of the utero-placental circulation. *Hum Reprod*. 2021; 36: 571–86. DOI: 10.1093/humrep/deaa303.
  14. Staff AC, Fjeldstad HE, Fosheim IK, Moe K, Turowski G, Johnsen GM, et al. Failure of physiological transformation and spiral artery atherosis: their roles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2022; 226: S895–S906. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.09.026.
  15. Sidorova IS. Solved and unsolved problems of preeclampsia in Russia (Editorial). *Russ Bull Obstet*. 2015; 15: 4–9. DOI: 10.17116/rosakush20151524-9.
  16. Rana S, Burke SD, Karumanchi SA. Imbalances in circulating angiogenic factors in the pathophysiology of preeclampsia and related disorders. *Am J Obstet Gynecol*. 2022; 226: S1019–S1034. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.10.022.
  17. Haram K, Mortensen JH, Myking O, Magann EF, Morrison JC. The role of oxidative stress, adhesion molecules and antioxidants in preeclampsia. *Curr Hypertens Rev*. 2019; 15: 105–12. DOI: 10.2174/1573402115666190119163942.
  18. Tomimatsu T, Mimura K, Matsuzaki S, Endo M, Kumasawa K, Kimura T. Preeclampsia: maternal systemic vascular disorder caused by generalized endothelial dysfunction due to placental antiangiogenic factors. *Int J Mol Sci*. 2019; 20. DOI: 10.3390/ijms20174246.
  19. Staff AC. The two-stage placental model of preeclampsia: An update. *J Reprod Immunol*. 2019; 134–135: 1–10. DOI: 10.1016/j.jri.2019.07.004.
  20. Than NG, Romero R, Tarca AL, Kekesi KA, Xu Y, Xu Z, et al. Integrated systems biology approach identifies novel maternal and placental pathways of preeclampsia. *Front Immunol*. 2018; 9: 1661. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01661.
  21. Castro KR, Prado KM, Lorenzon AR, Hoshida MS, Alves EA, Francisco RP, et al. Serum from preeclamptic women triggers endoplasmic reticulum stress pathway and expression of angiogenic factors in trophoblast cells. *Front Physiol*. 2021; 12: 799653. DOI: 10.3389/fphys.2021.799653.
  22. Yung HW, Atkinson D, Campion-Smith T, Olovsson M, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Differential activation of placental unfolded protein response pathways implies heterogeneity in causation of early- and late-onset pre-eclampsia. *J Pathol*. 2014; 234: 262–76. DOI: 10.1002/path.4394.
  23. Burton GJ, Yung H-W. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2011; 1: 72–78. DOI: 10.1016/j.preghy.2010.12.002.
  24. Timofeeva AV, Fedorov IS, Pirogova MM, Vasilchenko ON, Chagovets VV, Ezhova LS, et al. Clusterin and its potential regulatory microRNAs as a part of secretome for the diagnosis of abnormally invasive placenta: Accreta, Increta, and Percreta Cases. *Life (Basel, Switzerland)*. 2021; 11. DOI: 10.3390/life11040270.
  25. Janiszewska E, Kmiecik A, Kacperczyk M, Witkowska A, Kratz EM. The influence of clusterin glycosylation variability on selected pathophysiological processes in the human body. *Oxid Med Cell Longev*. 2022; 2022: 7657876. DOI: 10.1155/2022/7657876.
  26. Zoubeydi A, Gleave M. Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012; 44: 1646–56. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.04.010.
  27. Zeng S, Pan Y, Liu F, Yin J, Jiang M, Long Y, et al. Role of clusterin in the regulation of trophoblast development and preeclampsia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021; 583: 128–34. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.10.064.
  28. Satapathy S, Wilson MR. The dual roles of clusterin in extracellular and intracellular proteostasis. *Trends Biochem Sci*. 2021; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.005>.
  29. Zeng S, Han M, Jiang M, Liu F, Hu Y, Long Y, et al. Serum complement proteomics reveal biomarkers for hypertension disorder of pregnancy and the potential role of Clusterin. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021; 19: 56. DOI: 10.1186/s12958-021-00742-z.
  30. Watanabe H, Hamada H, Yamada N, Sohda S, Yamakawa-Kobayashi K, Yoshikawa H, et al. Proteome analysis reveals elevated serum levels of clusterin in patients with preeclampsia. *Proteomics*. 2004; 4: 537–43. DOI: 10.1002/pmic.200300565.
  31. Oztas E, Ozler S, Ersoy AO, Iskender CT, Sucak A, Ergin M, et al. Increased levels of serum clusterin is associated with intrauterine growth restriction and adverse pregnancy outcomes in preeclampsia. *J Perinat Med*. 2016; 44: 269–75. DOI: 10.1515/jpm-2015-0120.
  32. Trougakos IP. The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches — a mini-review. *Gerontology*. 2013; 59: 514–23. DOI: 10.1159/000351207.
  33. Shiota M, Zoubeydi A, Kumano M, Beraldi E, Naito S, Nelson CC, et al. Clusterin is a critical downstream mediator of stress-induced YB-1 transactivation in prostate cancer. *Mol Cancer Res*. 2011; 9: 1755–66. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0379.
  34. Criswell T, Klokov D, Beman M, Lavik JP, Boothman DA. Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Biol Ther*. 2003; 2: 372–80. DOI: 10.4161/cbt.2.4.430.
  35. Cervellera M, Raschella G, Santilli G, Tanno B, Ventura A, Mancini C, et al. Direct transactivation of the anti-apoptotic gene apolipoprotein J (clusterin) by B-MYB. *J Biol Chem*. 2000; 275: 21055–60. DOI: 10.1074/jbc.M002055200.
  36. Santilli G, Aronow BJ, Sala A. Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for IkappaB expression and regulation of NF-kappaB activity. *J Biol Chem*. 2003; 278: 38214–9. DOI: 10.1074/jbc.C300252200.
  37. Garg M. Targeting microRNAs in epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem cells: therapeutic approaches in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 19: 285–97. DOI: 10.1517/14728222.2014.975794.
  38. Nizard P, Tetley S, Le Dréan Y, Watrin T, Le Goff P, Wilson MR, et al. Stress-induced retrotranslocation of clusterin/ApoJ into the cytosol. *Traffic*. 2007; 8: 554–65. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2007.00549.x.
  39. Wilson MR, Zoubeydi A. Clusterin as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*. 2017; 21: 201–13. DOI: 10.1080/14728222.2017.1267142.
  40. Rohne P, Prochnow H, Wolf S, Renner B, Koch-Brandt C. The chaperone activity of clusterin is dependent on glycosylation and redox environment. *Cell Physiol Biochem Int J. Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2014; 34: 1626–39. DOI: 10.1159/000366365.
  41. Chen Y, Huang Y, Jiang R, Teng Y. Syncytiotrophoblast-derived microparticle shedding in early-onset and late-onset severe preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet*. 2012; 119: 234–38. DOI: 10.1016/j.ijgo.2012.07.010.
  42. Pillay P, Maharaj N, Moodley J, Mackraj I. Placental exosomes and pre-eclampsia: Maternal circulating levels in normal pregnancies and, early and late onset pre-eclamptic pregnancies. *Placenta*. 2016; 46: 18–25. DOI: 10.1016/j.placenta.2016.08.078.

## References

- Burton GJ, Redman CW, Roberts JM, Moffett A. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. *BMJ*. 2019; 366: l2381. DOI: 10.1136/bmj.l2381.
- Ananth CV, Lavery JA, Friedman AM, Wapner RJ, Wright JD. Serious maternal complications in relation to severe pre-eclampsia: a retrospective cohort study of the impact of hospital volume. *BJOG*. 2017; 124: 1246–53. DOI: 10.1111/1471-0528.14384.
- Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, et al. The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens*. 2018; 13: 291–310. DOI: 10.1016/j.preghy.2018.05.004.
- Pierrat V, Marchand-Martin L, Arnaud C, Kaminski M, Resche-Rigon M, Lebeaux C, et al. Neurodevelopmental outcome at 2 years for preterm children born at 22 to 34 weeks' gestation in France in 2011: EPIPAGE-2 cohort study. *BMJ*. 2017; 358: j3448. DOI: 10.1136/bmj.j3448.
- Van Beek PE, Rijken M, Broeders L, Ter Horst HJ, Koopman-Esseboom C, de Kort E, et al. Two-year neurodevelopmental outcome in children born extremely preterm: the EPI-DAF study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2022; 107: 467–74. DOI: 10.1136/archdischild-2021-323124.
- Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertens*. (Dallas, Tex. 1979). 2008; 51: 970–75. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107607.
- Garrido-Gomez T, Dominguez F, Quiñero A, Diaz-Gimeno P, Kapidzic M, Gormley M, et al. Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114: E8468–E8477. DOI: 10.1073/pnas.1706546114.
- Ruane PT, Berneau SC, Koeck R, Watts J, Kimber SJ, Brison DR, et al. Apposition to endometrial epithelial cells activates mouse blastocysts for implantation. *Mol Hum Reprod*. 2017; 23: 617–27. DOI: 10.1093/molehr/gax043.
- Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*. 2010; 31 Suppl: S66–9. DOI: 10.1016/j.placenta.2009.12.021.
- Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta*. 1983; 4: 397–413. DOI: 10.1016/S0143-4004(83)80043-5.
- Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JCP. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*. 2009; 30: 473–82. DOI: 10.1016/j.placenta.2009.02.009.
- James JL, Saghian R, Perwick R, Clark AR. Trophoblast plugs: impact on utero-placental haemodynamics and spiral artery remodelling. *Hum Reprod*. 2018; 33: 1430–41. DOI: 10.1093/humrep/dey225.
- Allerkamp HH, Clark AR, Lee TC, Morgan TK, Burton GJ, James JL. Something old, something new: digital quantification of uterine vascular remodelling and trophoblast plugging in historical collections provides new insight into adaptation of the uteroplacental circulation. *Hum Reprod*. 2021; 36: 571–86. DOI: 10.1093/humrep/deaa303.
- Staff AC, Fjeldstad HE, Fosheim IK, Moe K, Turowski G, Johnsen GM, et al. Failure of physiological transformation and spiral artery atherosclerosis: their roles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2022; 226: S895–S906. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.09.026.
- Sidorova IS. Solved and unsolved problems of preeclampsia in Russia (Editorial). *Russ Bull Obstet*. 2015; 15: 4–9. DOI: 10.17116/rosakush20151524-9.
- Rana S, Burke SD, Karumanchi SA. Imbalances in circulating angiogenic factors in the pathophysiology of preeclampsia and related disorders. *Am J Obstet Gynecol*. 2022; 226: S1019–S1034. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.10.022.
- Haram K, Mortensen JH, Myking O, Magann EF, Morrison JC. The role of oxidative stress, adhesion molecules and antioxidants in preeclampsia. *Curr Hypertens Rev*. 2019; 15: 105–12. DOI: 10.2174/1573402115666190119163942.
- Tomimatsu T, Mimura K, Matsuzaki S, Endo M, Kumazawa K, Kimura T. Preeclampsia: maternal systemic vascular disorder caused by generalized endothelial dysfunction due to placental antiangiogenic factors. *Int J Mol Sci*. 2019; 20. DOI: 10.3390/ijms20174246.
- Staff AC. The two-stage placental model of preeclampsia: An update. *J Reprod Immunol*. 2019; 134–135: 1–10. DOI: 10.1016/j.jri.2019.07.004.
- Than NG, Romero R, Tarca AL, Kekesi KA, Xu Y, Xu Z, et al. Integrated systems biology approach identifies novel maternal and placental pathways of preeclampsia. *Front Immunol*. 2018; 9: 1661. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01661.
- Castro KR, Prado KM, Lorenzon AR, Hoshida MS, Alves EA, Francisco RP, et al. Serum from preeclamptic women triggers endoplasmic reticulum stress pathway and expression of angiogenic factors in trophoblast cells. *Front Physiol*. 2021; 12: 799653. DOI: 10.3389/fphys.2021.799653.
- Yung HW, Atkinson D, Campion-Smith T, Olovsson M, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Differential activation of placental unfolded protein response pathways implies heterogeneity in causation of early- and late-onset pre-eclampsia. *J Pathol*. 2014; 234: 262–76. DOI: 10.1002/path.4394.
- Burton GJ, Yung H-W. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2011; 1: 72–78. DOI: 10.1016/j.preghy.2010.12.002.
- Timofeeva AV, Fedorov IS, Pirogova MM, Vasilchenko ON, Chagovets VV, Ezhova LS, et al. Clusterin and its potential regulatory microRNAs as a part of secretome for the diagnosis of normally invasive placenta: Accreta, Incretta, and Percreta Cases. *Life* (Basel, Switzerland). 2021; 11. DOI: 10.3390/life11040270.
- Janiszewska E, Krneciak A, Kacperczyk M, Witkowska A, Kratz EM. The influence of clusterin glycosylation variability on selected pathophysiological processes in the human body. *Oxid Med Cell Longev*. 2022; 2022: 7657876. DOI: 10.1155/2022/7657876.
- Zoubeidi A, Gleave M. Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012; 44: 1646–56. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.04.010.
- Zeng S, Pan Y, Liu F, Yin J, Jiang M, Long Y, et al. Role of clusterin in the regulation of trophoblast development and preeclampsia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021; 583: 128–34. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.10.064.
- Satapathy S, Wilson MR. The dual roles of clusterin in extracellular and intracellular proteostasis. *Trends Biochem Sci*. 2021; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.005>.
- Zeng S, Han M, Jiang M, Liu F, Hu Y, Long Y, et al. Serum complement proteomics reveal biomarkers for hypertension disorder of pregnancy and the potential role of Clusterin. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021; 19: 56. DOI: 10.1186/s12958-021-00742-z.
- Watanabe H, Hamada H, Yamada N, Sohda S, Yamakawa-Kobayashi K, Yoshikawa H, et al. Proteome analysis reveals elevated serum levels of clusterin in patients with preeclampsia. *Proteomics*. 2004; 4: 537–43. DOI: 10.1002/pmic.200300565.
- Oztaş E, Özler S, Ersoy AO, Iskender CT, Sucak A, Ergin M, et al. Increased levels of serum clusterin is associated with intrauterine growth restriction and adverse pregnancy outcomes in preeclampsia. *J Perinat Med*. 2016; 44: 269–75. DOI: 10.1515/jpm-2015-0120.
- Trougakos IP. The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches — a mini-review. *Gerontology*. 2013; 59: 514–23. DOI: 10.1159/000351207.
- Shiota M, Zoubeidi A, Kumano M, Beraldi E, Naito S, Nelson CC, et al. Clusterin is a critical downstream mediator of stress-induced YB-1 transactivation in prostate cancer. *Mol Cancer Res*. 2011; 9: 1755–66. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0379.
- Criswell T, Klokov D, Beman M, Lavik JP, Boothman DA. Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Biol Ther*. 2003; 2: 372–80. DOI: 10.4161/cbt.2.4.430.
- Cervellera M, Raschella G, Santilli G, Tanno B, Ventura A, Mancini C, et al. Direct transactivation of the anti-apoptotic gene

- apolipoprotein J (clusterin) by B-MYB. *J Biol Chem.* 2000; 275: 21055–60. DOI: 10.1074/jbc.M002055200.
36. Santilli G, Aronow BJ, Sala A. Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for I $\kappa$ B expression and regulation of NF- $\kappa$ B activity. *J Biol Chem.* 2003; 278: 38214–9. DOI: 10.1074/jbc.C300252200.
  37. Garg M. Targeting microRNAs in epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem cells: therapeutic approaches in cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2015; 19: 285–97. DOI: 10.1517/14728222.2014.975794.
  38. Nizard P, Tetley S, Le Dr an Y, Watrin T, Le Goff P, Wilson MR, et al. Stress-induced retrotranslocation of clusterin/ApoJ into the cytosol. *Traffic.* 2007; 8: 554–65. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2007.00549.x.
  39. Wilson MR, Zoubeidi A. Clusterin as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets.* 2017; 21: 201–13. DOI: 10.1080/14728222.2017.1267142.
  40. Rohne P, Prochnow H, Wolf S, Renner B, Koch-Brandt C. The chaperone activity of clusterin is dependent on glycosylation and redox environment. *Cell Physiol Biochem Int J. Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2014; 34: 1626–39. DOI: 10.1159/000366365.
  41. Chen Y, Huang Y, Jiang R, Teng Y. Syncytiotrophoblast-derived microparticle shedding in early-onset and late-onset severe pre-eclampsia. *Int J. Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet.* 2012; 119: 234–38. DOI: 10.1016/j.ijgo.2012.07.010.
  42. Pillay P, Maharaj N, Moodley J, Mackraj I. Placental exosomes and pre-eclampsia: Maternal circulating levels in normal pregnancies and, early and late onset pre-eclamptic pregnancies. *Placenta.* 2016; 46: 18–25. DOI: 10.1016/j.placenta.2016.08.078.

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ФАКТОРОВ РИСКА МИКРОЭМБОЛИИ С ВОЗРАСТОМ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Е. В. Орлова ✉, А. Б. Бердалин, В. Г. Лелюк

Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Выявление сопряженных с возрастом особенностей взаимодействия факторов риска развития микроэмболии может расширить представления о механизмах развития ишемического инсульта (ИИ). Целью исследования было изучить влияние возраста и других факторов риска инсульта на биофизические характеристики микроэмболических сигналов (МЭС), регистрируемых в восстановительном периоде ишемического инсульта. Транскраниальное доплеровское мониторирование с микроэмболодетекцией провели 515 лицам, в исследование были включены сведения о 28 пациентах, перенесших ишемический инсульт, из которых 9 (32%) женщин и 19 (68%) мужчин в возрасте 33–78 лет (средний возраст —  $58 \pm 13$  лет). При помощи смешанной линейной модели выявлено, что возраст и взаимодействие возраста с наличием фибрилляции предсердий оказывали влияние на мощность МЭС. С возрастом наблюдается увеличение мощности регистрируемых МЭС, особенно заметное у пациентов с фибрилляцией предсердий ( $p < 0,0005$ ). При кардиоэмболическом варианте ИИ мощность и длительность МЭС оказалась значимо больше у более пожилых лиц ( $p < 0,0005$ ). При отсутствии атеросклероза мощность МЭС с возрастом постепенно увеличивалась, а при его наличии — постепенно уменьшалась, при этом мощность МЭС у пациентов с атеросклерозом в целом (во всех возрастных группах) была достоверно выше ( $p < 0,0005$ ), чем при его отсутствии.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, возраст, фибрилляция предсердий, атеросклероз, микроэмболия

**Финансирование:** Государственное задание № 388-00083-22-00 от 30.12.2021, регистрационный номер НИР 122022100113-7 от 21 февраля 2022 г.

**Вклад авторов:** Е. В. Орлова — работа с источниками литературы, написание статьи, работа с базой данных, анализ полученных результатов; А. Б. Бердалин — работа с массивом данных, статистическая обработка результатов, участие в написании результатов исследования и их обсуждения; В. Г. Лелюк — планирование и руководство исследованием, поиск источников финансирования, редактирование статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФЦМН ФМБА России (протокол № 01/24-10-22 от 24 октября 2022 г.); все участники исследования подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Владимировна Орлова  
ул. Островитянова, д. 1/10, к. А8-008, г. Москва, 117513, Россия; [ekaterina.shlyk@gmail.com](mailto:ekaterina.shlyk@gmail.com)

**Статья получена:** 28.10.2022 **Статья принята к печати:** 29.11.2022 **Опубликована онлайн:** 12.12.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.058

## CORRELATION OF MICROEMBOLISM RISK FACTORS WITH AGE IN THE ISCHEMIC STROKE RECOVERY PERIOD

Orlova EV ✉, Berdalin AB, Lelyuk VG

Federal Center of Brain and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Identification of the age-related features of interaction between the risk factors of microembolism can improve understanding of the mechanisms underlying the development of ischemic stroke (IS). The study was aimed to assess the effects of age and other risk factors of stroke on the biophysical characteristics of microembolic signals (MES) recorded during the ischemic stroke recovery period. Transcranial Doppler ultrasound (TCD) involving microembolus detection (MED) was performed in 515 people, the data of 28 patients having a history of ischemic stroke, among them 9 women (32%) and 19 men (68%) aged 33–78 (average age  $58 \pm 13$  years), were included in the study. Using the mixed-effects linear model it was found that age and interaction between age and atrial fibrillation affected the power of MES. The increase in the power of the recorded MES with age is observed, that is especially evident in patients with atrial fibrillation ( $p < 0.0005$ ). As for cardioembolic IS variant, the power and duration of MES turn out to be significantly higher in elderly patients ( $p < 0.0005$ ). The power of MES gradually increases with age in patients with no atherosclerosis and gradually decreases in patients with atherosclerosis, while MES power in patients with atherosclerosis in general (all age groups) is significantly higher ( $p < 0.0005$ ) than that observed in patients with no atherosclerosis.

**Keywords:** ischemic stroke, age, atrial fibrillation, atherosclerosis, microembolism

**Funding:** State Assignment No. 388-00083-22-00 of 30.12.2021, research project No. 122022100113-7 of 21 February 2022

**Author contribution:** Orlova EV — literature review, manuscript writing, working with the database, analysis of the results; Berdalin AB — working with the dataset, statistical processing of the results, part in writing the results and the discussion; Lelyuk VG — study planning and management, search for sources of funding, manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Federal Center of Brain and Neurotechnologies of FMBA of Russia (protocol № 01/24-10-22 of 24 October 2022); the informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina V. Orlova  
Ostrovityanova, 1/10, k. A8-008, Moscow, 117513, Russia; [ekaterina.shlyk@gmail.com](mailto:ekaterina.shlyk@gmail.com)

**Received:** 28.10.2022 **Accepted:** 29.11.2022 **Published online:** 12.12.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.058

Эмболия в сосуды головного мозга является одной из наиболее частых причин развития ишемического инсульта (ИИ) [1–4]. Источники эмболии и сам эмболический материал при этом крайне гетерогенны [5]. Так, среди источников эмболов рассматривают фибрилляцию предсердий (ФП), атеросклероз кровоснабжающих мозг артерий, а также ряд более редких состояний, включая тромбозы в системе нижней

полной вены, поражения клапанов сердца и ряд других [2, 6–8].

Известно, что наличие ФП приводит к пятикратному увеличению риска инсульта и двукратному увеличению смертности от него [9]. ФП — одно из самых распространенных нарушений ритма [10–12], ее частота достигает 2–4% всей популяции, и увеличивает риск ишемического инсульта в среднем примерно от 0,2 до 20% в



год [13, 14]. Основной причиной ФП считают артериальную гипертензию. В средних и старших возрастных группах ФП признана самой частой причиной кардиогенной церебральной эмболии [10–12]. Имеются сведения, что риск инсульта увеличивается с длительностью ФП и, соответственно, возрастом [10, 15].

Атеросклероз в качестве причины ИИ реализует свой потенциал различными путями: посредством атеротромбоза, гипоперфузии или артерио-артериальной эмболии [1, 2]. Частота каждого из обозначенных механизмов точно не установлена, но известно, что наиболее редким из трех является гипоперфузия [5, 6].

Сведения о характере и частоте церебральной эмболии из других источников еще более ограничены [8, 16].

Во многом это связано с распространенностью среди перенесших инсульт лиц ситуаций, в которых потенциальных причин инсульта больше одной, а также сложностями верификации даже самого факта эмболии [1]. Единственной прижизненной возможностью выявления и оценки интенсивности и, по косвенным характеристикам, — природы эмболов посредством выделения сигналов от них из доплеровских спектров потоков в мозговых артериях, является транскраниальное доплеровское мониторирование с микроэмболодетекцией (ТКДМ с МЭД) [17]. Регистрируемые указанным методом микроэмболические сигналы (МЭС) расценивают как независимый фактор развития ИИ и транзиторных ишемических атак [2–4]. Использование метода ограничено отсутствием височного акустического доступа.

Несмотря на то что результаты исследований, посвященных изучению наличия и интенсивности МЭС при различных состояниях, широко публиковались, сведений о факторах, влияющих на эмболию, ее интенсивность, а также биофизические характеристики МЭС, их взаимодействие, немного [2–5, 16].

Так, установлено, что бессимптомная и пароксизмальная ФП с меньшей интенсивностью МЭС более благоприятна по сравнению с хронической и симптомной ФП, при которой выявляется достоверно большее число МЭС. Дальнейшие исследования должны подтвердить, имеют ли МЭС прогностическое значение у пациентов с хронической ФП, склонных к ишемическому инсульту [16].

Наличие МЭС сопряжено со значительным возрастанием риска ИИ и может быть предиктором раннего рецидива ИИ [1].

В связи с тем, что этиология и патогенез ИИ и ТИА у более молодых лиц отличаются от таковых в старших возрастных группах [6, 18, 19], установление сопряженных с возрастом особенностей взаимодействия факторов риска развития микроэмболии может не только иметь прикладное значение, но и расширить представления о механизмах развития инсульта.

Известное ограничение всех наблюдательных исследований — невозможность в полной мере учесть взаимодействие влияющих на событие (характеристику, параметр) факторов. В частности, действительно ли ФП (или иной фактор риска ИИ) связана с регистрируемыми МЭС или эта зависимость сомнительна и имеет место вследствие того, что лица с ФП старше, а микроэмболия на самом деле связана с возрастом. Следовательно, применение статистических методов (см. «Пациенты и методы»), хотя бы частично разделяющих взаимодействующие факторы (например, ФП и возраст), перспективно, поскольку позволяет приблизиться к пониманию причинно-следственных связей, обуславливающих появление МЭС.

Целью настоящего исследования было изучить влияние возраста и других факторов риска инсульта на биофизические характеристики МЭС, регистрируемых в восстановительном периоде ишемического инсульта.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

По итогам коллегиального рассмотрения результатов мультимодального инструментального исследования 1600 клинических случаев ИИ в восстановительном периоде решением группы экспертов, в которую входили врачи ультразвуковой и функциональной диагностики, рентгенологи, неврологи, старшие научные сотрудники и руководитель отдела ультразвуковой и функциональной диагностики, было отобрано 515 лиц, которым было проведено ТКДМ с МЭД в период с 2019 по 2021 г. По дизайну наше исследование представляло собой поперечное наблюдательное исследование, часть проспективного когортного.

Критерии включения в исследование: наличие ИИ в анамнезе, наличие потенциальных источников эмболии по результатам комплексного ультразвукового исследования.

Критерии исключения: отсутствие височного акустического доступа для проведения ТКДМ с МЭД.

При постобработке записей признаки МЭС были выявлены у 46 пациентов из 515 мониторингов (8,9%). После анализа полученных МЭС ввиду технических трудностей, которые имели случайный характер, значение биофизических характеристик МЭС удалось получить не у всех пациентов. Таким образом, в исследование были включены сведения о 28 пациентах, перенесших ИИ, из которых 9 (32%) женщин и 19 (68%) мужчин, в возрасте от 33 до 78 лет (средний возраст —  $58 \pm 13$  лет).

Включенные в исследование лица проходили стационарное лечение в отделениях медицинской реабилитации ФГБУ «ФЦМН» ФМБА России. Всем пациентам были проведены следующие виды исследований.

1. Дуплексное сканирование брахиоцефальных артерий (ДС БЦА), транскраниальное дуплексное сканирование (ТКДС) и трансторакальная эхокардиография (ЭхоКГ), которые были выполнены на сканерах Epiq 7 (Philips; США); экстракраниальные отделы БЦА — широкополосными мультиточечными линейными датчиками с частотой 3–12 МГц, ТКДС и ЭхоКГ — широкополосными мультиточечными секторными датчиками с частотой 1–5 МГц.

2. ТКДМ с МЭД проводили на сканере Ангиодин-Универсал (АО «НПФ БИОСС»; Россия) импульсно-волновыми датчиками с частотой 2 МГц, фиксированными в шлеме Спенсера. Локацию спектров потоков в СМА или ЗМА одновременно с двух сторон выполняли через височный акустический доступ; длительность сканирования составила 60 мин в положении лежа или сидя [17]. Для минимизации артефактов при проведении исследования использовали минимально возможные уровни усиления и мощности, обеспечивавшие сохранность доплеровского спектра. Регистрация МЭС во время мониторингов происходила автоматически с использованием программы Bionita Cabinet (Biosoft-M; Россия), дальнейший анализ результатов и дифференцировку МЭС от артефактов проводили вручную. При проведении исследования размер метки контрольного объема составлял 20 мм, локацию производили на глубине 50–60 мм.

В случаях наличия признаков эмболии оценивали ее интенсивность (число МЭС в час), для каждого МЭС — длительность (косвенная характеристика размера

Таблица 1. Основные сведения о включенных в исследование лицах

Характеристики	Число, абс.		Доля, %
Пол	Мужской	19	67,90
	Женский	9	32,10
	Всего	28	100
Возраст	≤ 50 лет	9	32,10
	50 лет	19	67,90
	Всего	28	100
Патогенетический вариант ИИ	Атеротромботический	7	25
	Кардиоэмболический	6	21,40
	Криптогенный	14	50
	Лакунарный	1	3,60
	Всего	28	100
Бассейн поражения	Вертебрально-базилярный	7	25
	Каротидный	21	75
	Всего	28	100
Сторона поражения	С обеих сторон	4	14,30
	Слева	9	32,10
	Справа	15	53,60
	Всего	28	100
Наличие артериальной гипертензии	Нет	5	17,90
	Да	23	82,10
	Всего	28	100
Наличие сахарного диабета	Нет	18	64,30
	Да	10	35,70
	Всего	28	100
Наличие ФП	Нет	23	82,10
	Да	5	17,90
	Всего	28	100

эмбола, мс), частоту (косвенная характеристика структуры эмбола, Гц), мощность (интегральная характеристика эмбола, дБ).

3. Электрокардиографию (ЭКГ) выполняли с применением электрокардиографа Нейрософт с программным обеспечением «Поли-спектр» («Нейрософт»; Россия) по стандартной методике.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программных пакетов SPSS Statistics версии 26.0 (IBM; США) и R software версии 4.0.2. (R Core Team; Австрия). Нулевую гипотезу отвергали при уровне значимости  $p \leq 0,05$ . Для описания количественных переменных применяли среднее арифметическое и стандартное отклонение или медиану и квартили (в случае несоответствия распределения нормальному), для качественных — частоту и долю (в процентах). Соответствие распределения количественных переменных нормальному проверяли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для оценки влияния ФП и внутрисосудистых образований в сонных артериях на биофизические характеристики МЭС с поправкой на

возраст и учетом каждого отдельного МЭС использовали смешанную линейную модель с вложенными данными.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основные сведения о включенных в исследование пациентах представлены в табл. 1.

Инфарктов миокарда, коронарных стентирований, каротидной эндартерэктомии, диссекций брахиоцефальных артерий зарегистрировано не было.

Данные о степени выраженности стенозов экстракраниальных отделов БЦА представлены в табл. 2.

У всех лиц, включенных в исследование, при проведении ТКДМ с МЭД имели место МЭС. Всего было выделено 938 МЭС. Общие сведения по числу и характеристикам МЭС представлены в табл. 3.

Различия биофизических характеристик МЭС у пациентов с наличием и отсутствием ФП оказались достоверными ( $p < 0,05$ ).

По результатам анализа влияния ФП на характеристики МЭС с поправкой на возраст при помощи смешанной

Таблица 2. Сведения о степени стенозов сонных артерий пациентов, включенных в исследование

	Медиана	1-й квартиль	3-й квартиль	Максимум	Минимум
Степень стеноза правой ОСА (%)	33	30	40	50	20
Степень стеноза левой ОСА (%)	35	30	48	50	25
Степень стеноза правой ВСА (%)	35	30	40	100	25
Степень стеноза левой ВСА (%)	35	30	50	70	20

Таблица 3. Биофизические характеристики и число МЭС

	Среднее	Стандартное отклонение	Медиана	25-й перцентиль	75-й перцентиль	Максимум	Минимум
Общее число МЭС у пациента	34	105	3	1	10	532	1
Средняя мощность МЭС (дБ)	11,06	3,32	10,22	8,31	14,2	17,75	7,28
Средняя продолжительность МЭС (мс)	9,06	4,86	7,09	6	11,33	23,66	4,67
Средняя частота МЭС (Гц)	528,19	241,8	475,92	328	750	968	230,5

линейной модели было выявлено, что влияние возраста пациента, а также взаимодействия возраста и наличия ФП на мощность регистрируемых МЭС значимо ( $p < 0,0005$ ), что указывает на модифицирующее влияние одного параметра на эффект другого (рис. 1). При этом изолированный эффект ФП (с поправкой на возраст) оказался незначимым ( $p = 0,109$ ). Таким образом, с возрастом происходит увеличение мощности регистрируемых МЭС, особенно заметное у пациентов с ФП. Другими словами, ФП приводила к увеличению мощности МЭС только у пожилых лиц, а у молодых наличие ФП значимых различий мощности МЭС не продемонстрировало.

В смешанной линейной модели оценки влияния на мощность и длительность регистрируемых МЭС типа инсульта (кардиоэмболического/некардиоэмболического) с поправкой на возраст, значимыми оказались параметры возраста ( $p < 0,0005$ ), а также взаимодействие возраста и варианта ИИ ( $p < 0,001$ ) (рис. 2). Вид закономерности оказался в целом аналогичным модели с ФП, т. е. различия между кардиоэмболическими инсультами и инсультами другой этиологии были значимыми только у лиц с ИИ старшего возраста.

При построении смешанной линейной модели влияния наличия атеросклеротических бляшек (АСБ) в сонных артериях на биофизические характеристики регистрируемых МЭС в зависимости от возраста значимыми параметрами оказались наличие АСБ в правой и левой общей сонной артерии (ОСА) и взаимодействие этих факторов с возрастом ( $p < 0,0005$ ) (рис. 3).

Собственно факт наличия АСБ в сонных артериях, согласно полученным результатам, был ассоциирован с большей мощностью МЭС, при этом тренды зависимости мощности от возраста были взаимосвязаны с наличием АСБ. Другими словами, если АСБ в сонных артериях не выявлялось, мощность МЭС с возрастом постепенно увеличивалась, а при их наличии, напротив, постепенно уменьшалась.

С целью анализа конкурирующих причин развития ИИ была построена линейная смешанная модель,

учитывающая влияние на мощность и длительность МЭС таких факторов риска, как наличие ФП и АСБ в сонных артериях одновременно с учетом возраста. Однако взаимодействие означенных параметров оказалось статистически незначимым ( $p > 0,05$ ), т. е. в нашем исследовании влияние факта наличия АСБ и ФП на биофизические характеристики МЭС оказались несвязанными друг с другом.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Осуществленное исследование имеет ряд ограничений. Первое связано с собственно эмболическим событием, интенсивностью и природой эмболического материала, второе — с методикой ТКДМ с МЭД. Эмболия в мозговые артерии чаще всего дискретна, а ее интенсивность вариабельна [4, 17]. Кроме того, эмболами могут быть фрагменты тромбов различной давности, а также атеросклеротических бляшек, клапанов, элементов сосудистой стенки и т. д. [1, 5, 16]. Следовательно, в одном и том же случае биофизические параметры МЭС могут существенно различаться. Методические детерминанты в основном являются следствием недостатков программного обеспечения, посредством которого МЭС выделяется из шума спектра [17]. Как видно из приведенных фактов, получаемые используемым способом результаты не могут быть рассмотрены как отражающие полную картину, однако к настоящему времени такой подход является единственно возможным прижизненным методом исследования эмболии в церебральное русло.

В связи с указанными ограничениями можно констатировать, что в проведенном исследовании были получены результаты, отражающие зависимость биофизических характеристик МЭС от возраста пациента и возраста во взаимодействии с другими факторами риска ИИ, которые требуют дальнейшего анализа.

Ряд исследователей ставят под сомнение тот факт, что ФП является основной причиной кардиоэмболических осложнений сама по себе, предполагая, что ФП служит

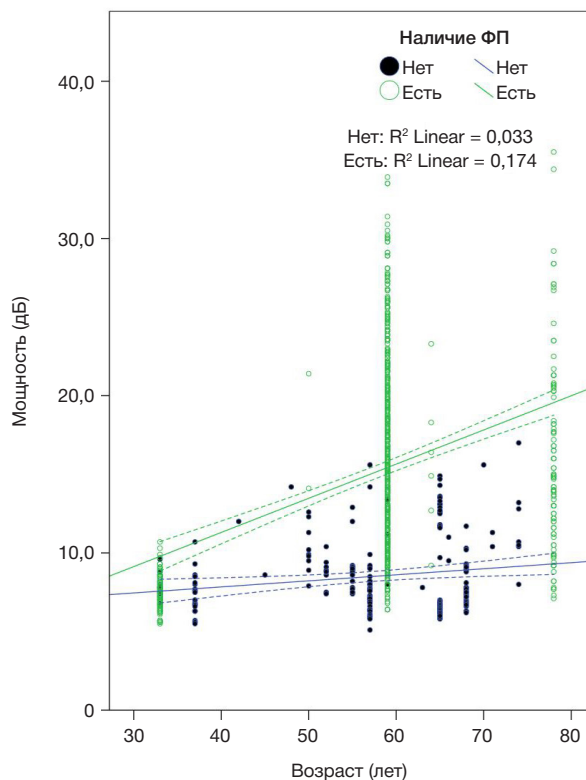
Таблица 4. Биофизические характеристики МЭС у пациентов с наличием и отсутствием ФП

		Наличие ФП	
		нет	есть
Число МЭС у пациента уточненное	Среднее	8,8333	149
	Стандартное отклонение	13,2588	219,7476
Средняя мощность МЭС	Среднее	10,0763	14,7022
	Стандартное отклонение	2,4233	4,1322
Средняя продолжительность МЭС	Среднее	7,5597	15,4918
	Стандартное отклонение	2,5796	6,955
Средняя частота МЭС	Среднее	500,7776	612,8418
	Стандартное отклонение	237,8698	223,7408
Средний ЭИ МЭС	Среднее	0,0803	0,2784
	Стандартное отклонение	0,0449	0,1675

своеобразным маркером предсердной кардиопатии, которую можно рассматривать как непосредственную причину кардиоэмболии [7, 20, 21]. Имеются также сведения о связи маркеров предсердной кардиопатии и ИИ независимо от наличия ФП [22, 23].

К настоящему времени в источниках литературы не встречалось исследований, в которых анализируется влияние факторов риска развития ИИ на биофизические характеристики МЭС. По результатам нашего исследования при построении смешанной линейной модели влияния возраста и ФП на биофизические характеристики МЭС, показатель возраста и взаимодействие возраста с наличием ФП оказались значимыми. Мощность МЭС, являющаяся интегральной биофизической характеристикой, косвенно отражающей одновременно размер и структуру микроэмбола, зависит от возраста с поправкой на наличие ФП. Из полученных данных следует также, что у молодых пациентов мощность МЭС (при условии их регистрации) от наличия ФП не зависит, а ФП оказывает влияние на мощность МЭС по мере увеличения возраста, т. е. у более пожилых пациентов. Вероятно, это может быть связано с тем, что только у них происходит достаточно выраженное замедление кровотока, главным образом, в ушке левого предсердия при наличии ФП, что в сочетании с возможными другими факторами приводит к тромбообразованию и реализации кардиоэмболии в сосуды головного мозга. Отчасти это подтверждают данные литературы, согласно которым риск инсульта увеличивается вместе с тяжестью эктопической предсердной активности, усугубляющейся с возрастом. Однако этот риск частично может быть обусловлен протромботической дисфункцией, сопутствующей предсердной кардиопатии, в дополнение к собственно аритмии [10, 21]. Нельзя исключить и влияние других неочевидных факторов, имитирующих подобный эффект. Развитие ФП вследствие ремоделирования предсердий требует времени, и частота такой ФП больше у лиц старшего возраста. У более молодых ФП может быть связана с другими факторами (наследственной предрасположенностью), а не с изменениями стенки предсердий — косвенно это подтверждает набирающую в последнее время популярность точку зрения, что кардиоэмболия связана не с самой ФП, а с изменениями в стенке предсердия, например воспалительной реакцией [11, 21, 24]. Сама ФП вызвана теми же процессами ремоделирования. У более молодых пациентов ФП, не связанная с ремоделированием предсердий, не является и причиной МЭС.

При анализе аналогичной модели, в которой вместо наличия ФП бинарно учитывали вариант инсульта (в модификации кардиоэмболический / некардиоэмболический) прослеживается зависимость двух характеристик МЭС (мощности и длительности) по мере увеличения возраста от варианта инсульта, причем при кардиоэмболическом варианте значения этих характеристик оказываются значимо выше именно у пожилых пациентов. Вероятно, выявленная закономерность отражает возникновение микроэмболов большего размера при реализации факторов, приводящих к кардиоэмболическому инсульту у пожилых пациентов, что также может быть связано с большим числом факторов, способствующих тромбообразованию по мере увеличения возраста. Нельзя также не учитывать, что отчасти это может быть связано с почти обязательным отнесением ИИ к кардиоэмболическому варианту по критериям TOAST [25] при наличии ФП.



Источник	F-статистика	Значимость, $p$
Скорректированная модель	374,728	< 0,0005
Возраст	24,978	< 0,0005
ФП	2,571	0,109
Взаимодействие возраста и ФП	13,718	< 0,0005

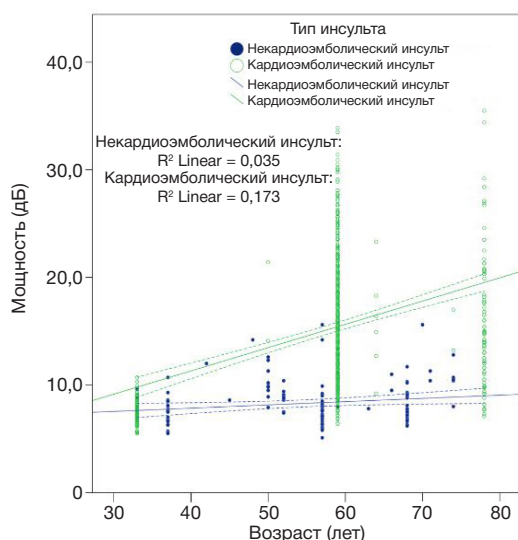
Рис. 1. Смешанная линейная модель влияния возраста и ФП на мощность МЭС

Смешанная линейная модель, учитывающая наличие АСБ в сонных артериях в сочетании с возрастом, позволяет констатировать, что по мере увеличения возраста влияние атеросклероза на значение мощности МЭС постепенно уменьшается. Однако очевидно, что при наличии АСБ в сонных артериях как среди молодых, так и среди пожилых пациентов, мощность МЭС оказалась статистически значимо выше по сравнению с пациентами без АСБ. Можно предположить, что атеросклероз и артерио-артериальная эмболия являются одним из основных патогенетических механизмов возникновения острой фокальной церебральной ишемии независимо от возраста. Нельзя также исключить тот факт, что в структуре эмболических событий помимо атеросклероза с возрастом значимое место могут занимать кардиальные источники, что объясняет постепенное повышение мощности МЭС с возрастом при отсутствии АСБ в сонных артериях.

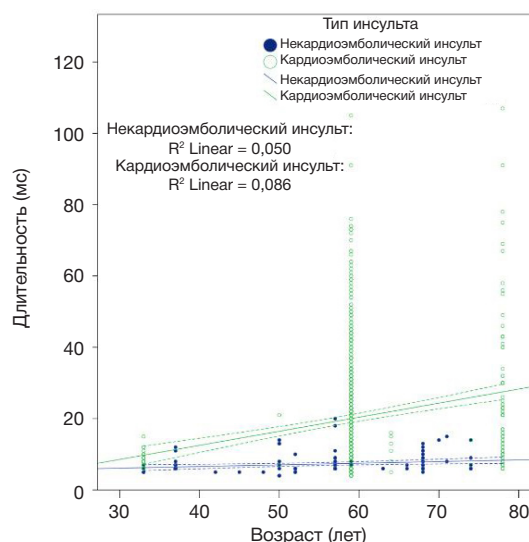
Имеются данные о влиянии на исходы ишемических событий сопутствующего атеросклеротического поражения сосудов с ФП. Так, выявлено, что отягощение в виде комбинации атеросклероза церебральных артерий с ФП может быть кумулятивным маркером высокого риска неблагоприятных сосудистых исходов [26]. В нашем исследовании было изучено влияние на мощность и длительность МЭС наличия ФП и атеросклеротических изменений в сонных артериях одновременно с учетом возраста, которое оказалось статистически незначимым, т. е. положение, высказанное ранее [26], подтверждения не нашло.



А



Б



Источник	F-статистика модели влияния на мощность МЭС	<i>p</i>	F-статистика модели влияния на длительность МЭС	<i>p</i>
Скорректированная модель	240,572	< 0,0005	1518,162	< 0,0005
Возраст	19,922	< 0,0005	16,181	< 0,0005
Тип инсульта (бинарно)	2,226	0,136	1,913	0,167
Взаимодействие возраста и типа инсульта	11,58	< 0,001	10,801	< 0,001

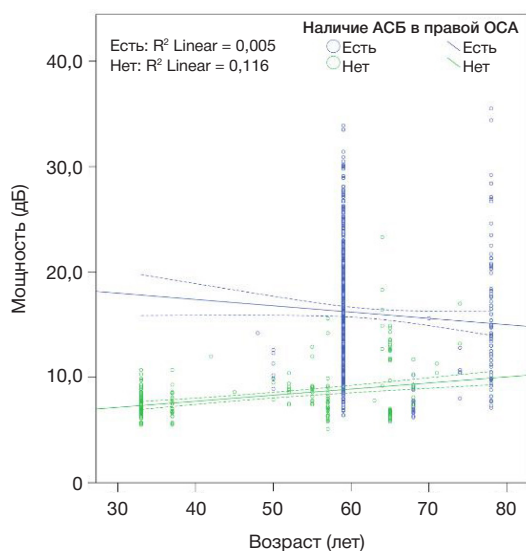
**Рис. 2.** Смешанная линейная модель влияния возраста и типа инсульта на мощность и длительность МЭС. **А.** Смешанная линейная модель влияния возраста и типа инсульта на мощность МЭС. **Б.** Смешанная линейная модель влияния возраста и типа инсульта на длительность МЭС

Таким образом, результаты применения метода ТКДМ с МЭД могут быть использованы для дифференцированного персонализированного подхода ко вторичной профилактике ИИ у групп пациентов с различными сочетаниями факторов риска.

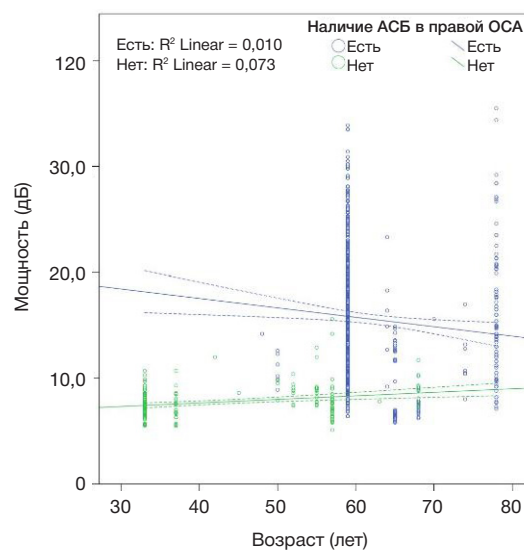
## ВЫВОДЫ

Возраст и ассоциация возраста с наличием ФП оказывают влияние на мощность МЭС у лиц, перенесших ИИ, в восстановительном периоде. Прослеживается

А



Б



Источник	F-статистика (правая ОА)	<i>p</i>	F-статистика (левая ОА)	<i>p</i>
Скорректированная модель	63 017,362	< 0,0005	16 882,306	< 0,0005
Возраст	5,723	0,017	3,851	0,05
Наличие АСБ в ОА	129,205	< 0,0005	53,639	< 0,0005
Взаимодействие возраста и наличия АСБ в ОА	24,601	< 0,0005	18,659	< 0,0005

**Рис. 3.** Смешанная линейная модель влияния возраста и наличия АСБ в правой и левой ОА на мощность МЭС. **А.** Смешанная линейная модель влияния возраста и наличия АСБ в правой ОА на мощность МЭС. **Б.** Смешанная линейная модель влияния возраста и наличия АСБ в левой ОА на мощность МЭС

зависимость мощности и длительности МЭС по мере увеличения возраста от варианта инсульта, причем при кардиоэмболическом варианте значения этих характеристик оказываются значимо больше именно у более пожилых лиц. По полученным нами данным, у пациентов с наличием АСБ в сонных артериях мощность МЭС с возрастом постепенно снижается, а у пациентов без атеросклероза наоборот, при этом мощность МЭС у пациентов с атеросклерозом в целом (во всех возрастных

группах) была выше. Влияние на мощность и длительность МЭС ФП и наличия АСБ в сонных артериях одновременно с учетом возраста оказалось статистически незначимым. Результаты исследования позволяют расширить спектр диагностической информации, получаемой при проведении ТКДМ с МЭД у групп пациентов с различными сочетаниями факторов риска в восстановительном периоде ИИ, что может оказать влияние на тактику проведения вторичной профилактики.

## Литература

1. Bazan R, Luvizutto GJ, Braga GP, et al. Relationship of spontaneous microembolic signals to risk stratification, recurrence, severity, and mortality of ischemic stroke: a prospective study. *Ultrasound J.* 2020; 12 (1): 6.
2. Liu WS, Zhu SF, Liu WF, Li GL, Jiang HQ. Relationship between microemboli in the internal carotid artery and the occurrence of ischemic stroke after transient ischemic attack. *J Clin Neurosci.* 2013; 20 (10): 1366–70.
3. Yan J, Li Z, Wills M, Rajah G, Wang X, Bai Y, Dong P, Zhao X. Intracranial microembolic signals might be a potential risk factor for cognitive impairment. *Neurol Res.* 2021; 43 (11): 867–73. DOI: 10.1080/01616412.2021.1939488. Epub 2021 Aug 19. PMID: 34409926.
4. Das AS, Regenhardt RW, LaRose S, Monk AD, Castro PM, Sheriff FG, et al. Microembolic Signals Detected by Transcranial Doppler Predict Future Stroke and Poor Outcomes. *J Neuroimaging.* 2020; 30 (6): 882–9. DOI: 10.1111/jon.12749. Epub 2020 Jul 10. PMID: 32648610; PMCID: PMC7721963.
5. Best LM, Webb AC, Gurusamy KS, Cheng SF, Richards T. Transcranial Doppler Ultrasound Detection of Microemboli as a Predictor of Cerebral Events in Patients with Symptomatic and Asymptomatic Carotid Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2016; 52 (5): 565–80. DOI: 10.1016/j.ejvs.2016.05.019.
6. Скворцова В. И., Кольцова Е. А., Кимельфельд Е. И. Сравнительный анализ факторов риска и патогенетических вариантов ишемического инсульта в молодом и пожилом возрасте. *Человек и его здоровье.* 2012; 3: 81–87.
7. Brambatti M, Connolly SJ, Gold MR, Morillo CA, Capucci A, Muto C, et al. Temporal relationship between subclinical atrial fibrillation and embolic events. *Circulation.* 2014; 129 (21): 2094–9.
8. Cho H, Kim T, Song IU, Chung SW. The Prevalence of Microembolic Signals in Transcranial Doppler Sonography with Bubble Test in Acute Ischemic Stroke. *J Ultrasound Med.* 2022; 41 (2): 439–46.
9. Migdady I, Russman A, Buletko AB. Atrial Fibrillation and Ischemic Stroke: A Clinical Review. *Semin Neurol.* 2021; 41 (4): 348–64.
10. Healey JS, Amit G, Field TS. Atrial fibrillation and stroke: how much atrial fibrillation is enough to cause a stroke? *Curr Opin Neurol.* 2020; 33 (1): 17–23.
11. Maida CD, Norrito RL, Daidone M, Tuttolomondo A, Pinto A. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (18): 6454. Published 2020 Sep 4. DOI: 10.3390/ijms21186454.
12. Pistoia F, Sacco S, Tiseo C, Degan D, Ornello R, Carolei A. The Epidemiology of Atrial Fibrillation and Stroke. *Cardiol Clin.* 2016; 34 (2): 255–68.
13. Haeusler KG, Tütüncü S, Schnabel RB. Detection of Atrial Fibrillation in Cryptogenic Stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2018; 18 (10): 66.
14. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, et al. ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J.* 2016; 37: 2893–962.
15. Spence JD. Stroke: Atrial fibrillation, stroke prevention therapy and aging. *Nat Rev Cardiol.* 2009; 6 (7): 448–50. DOI: 10.1038/nrcardio.2009.98. PMID: 19554003.
16. Kumral E, Balkir K, Uzuner N, Evyapan D, Nalbantgil S. Microembolic signal detection in patients with symptomatic and asymptomatic lone atrial fibrillation. *Cerebrovasc Dis.* 2001; 12 (3): 192–6.
17. Ringelstein EB, Droste DW, Babikian VL, Evans DH, Grosset DG, Kaps M, et al. Consensus on microembolus detection by TCD. International Consensus Group on Microembolus Detection. *Stroke.* 1998; 29 (3): 725–9. DOI: 10.1161/01.str.29.3.725. PMID: 9506619.
18. Dmytriw AA, Dibas M, Schirmer CM, et al. North American Neurovascular COVID-19 (NAN-C) Consortium. Age and Acute Ischemic Stroke Outcome in North American Patients With COVID-19. *J Am Heart Assoc.* 2021; 10 (14): 021046.
19. George MG. Risk Factors for Ischemic Stroke in Younger Adults: A Focused Update. *Stroke.* 2020; 51 (3): 729–35. DOI: 10.1161/STROKEAHA.119.024156. Epub 2020 Feb 12. PMID: 32078487; PMCID: PMC7112557.
20. Shaik TA, Haseeb M, Faisal S, et al. Impact of Catheter Ablation on Long-Term Outcomes in Patients With Atrial Fibrillation: A Meta-Analysis. *Cureus.* 2022; 14 (9): e29202. Published 2022 Sep 15. DOI: 10.7759/cureus.29202.
21. Sajeev JK, Kalman JM, Dewey H, Cooke JC, Teh AW. The Atrium and Embolic Stroke: Myopathy Not Atrial Fibrillation as the Requisite Determinant? *JACC Clin Electrophysiol.* 2020; 6 (3): 251–61. DOI: 10.1016/j.jacep.2019.12.013.
22. Kamel H, Soliman EZ, Heckbert SR, Kronmal RA, Longstreth WT Jr, Nazarian S, et al. P-wave morphology and the risk of incident ischemic stroke in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Stroke.* 2014; 45 (9): 2786–8.
23. Keach JW, Bradley SM, Turakhia MP, Maddox TM. Early detection of occult atrial fibrillation and stroke prevention. *Heart.* 2015; 101 (14): 1097–102.
24. Ronsoni RM, Saffi MAL, Gonçalves MVM, Nakayama IH, Luz Leiria TL. A New Vision at the Interface of Atrial Fibrillation and Stroke. *Front Cardiovasc Med.* 2021; 8: 689313. Published 2021 Aug 9. DOI: 10.3389/fcvm.2021.689313.
25. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 1993; 24 (1): 35–41. DOI: 10.1161/01.str.24.1.35. PMID: 7678184.
26. Park JH, Chung JW, Bang OY, et al. Atherosclerotic Burden and Vascular Risk in Stroke Patients With Atrial Fibrillation. *Stroke.* 2021; 52 (5): 1662–72.

## References

1. Bazan R, Luvizutto GJ, Braga GP, et al. Relationship of spontaneous microembolic signals to risk stratification, recurrence, severity, and mortality of ischemic stroke: a prospective study. *Ultrasound J.* 2020; 12 (1): 6.

2. Liu WS, Zhu SF, Liu WF, Li GL, Jiang HQ. Relationship between microemboli in the internal carotid artery and the occurrence of ischemic stroke after transient ischemic attack. *J Clin Neurosci*. 2013; 20 (10): 1366–70.
3. Yan J, Li Z, Wills M, Rajah G, Wang X, Bai Y, Dong P, Zhao X. Intracranial microembolic signals might be a potential risk factor for cognitive impairment. *Neurol Res*. 2021; 43 (11): 867–73. DOI: 10.1080/01616412.2021.1939488. Epub 2021 Aug 19. PMID: 34409926.
4. Das AS, Regenhardt RW, LaRose S, Monk AD, Castro PM, Sheriff FG, et al. Microembolic Signals Detected by Transcranial Doppler Predict Future Stroke and Poor Outcomes. *J Neuroimaging*. 2020; 30 (6): 882–9. DOI: 10.1111/jon.12749. Epub 2020 Jul 10. PMID: 32648610; PMCID: PMC7721963.
5. Best LM, Webb AC, Gurusamy KS, Cheng SF, Richards T. Transcranial Doppler Ultrasound Detection of Microemboli as a Predictor of Cerebral Events in Patients with Symptomatic and Asymptomatic Carotid Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2016; 52 (5): 565–80. DOI: 10.1016/j.ejvs.2016.05.019.
6. Skvorcova VI, Kolcova EA, Kimelfeld EI. Sravnitel'nyj analiz faktorov riska i patogeneticheskix variantov ishemicheskogo insulta v molodom i pozhilom vozraste. *Chelovek i ego zdorov'e*. 2012; 3: 81–87. Russian.
7. Brambatti M, Connolly SJ, Gold MR, Morillo CA, Capucci A, Muto C, et al. Temporal relationship between subclinical atrial fibrillation and embolic events. *Circulation*. 2014; 129 (21): 2094–9.
8. Cho H, Kim T, Song IU, Chung SW. The Prevalence of Microembolic Signals in Transcranial Doppler Sonography with Bubble Test in Acute Ischemic Stroke. *J Ultrasound Med*. 2022; 41 (2): 439–46.
9. Migdady I, Russman A, Buletko AB. Atrial Fibrillation and Ischemic Stroke: A Clinical Review. *Semin Neurol*. 2021; 41 (4): 348–64.
10. Healey JS, Amit G, Field TS. Atrial fibrillation and stroke: how much atrial fibrillation is enough to cause a stroke? *Curr Opin Neurol*. 2020; 33 (1): 17–23.
11. Maida CD, Norrito RL, Daidone M, Tuttolomondo A, Pinto A. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (18): 6454. Published 2020 Sep 4. DOI: 10.3390/ijms21186454.
12. Pistoia F, Sacco S, Tiseo C, Degan D, Ornello R, Carolei A. The Epidemiology of Atrial Fibrillation and Stroke. *Cardiol Clin*. 2016; 34 (2): 255–68.
13. Haeusler KG, Tütüncü S, Schnabel RB. Detection of Atrial Fibrillation in Cryptogenic Stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2018; 18 (10): 66.
14. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, et al. ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J*. 2016; 37: 2893–962.
15. Spence JD. Stroke: Atrial fibrillation, stroke prevention therapy and aging. *Nat Rev Cardiol*. 2009; 6 (7): 448–50. DOI: 10.1038/nrcardio.2009.98. PMID: 19554003.
16. Kumral E, Balkir K, Uzuner N, Evyapan D, Nalbantgil S. Microembolic signal detection in patients with symptomatic and asymptomatic lone atrial fibrillation. *Cerebrovasc Dis*. 2001; 12 (3): 192–6.
17. Ringelstein EB, Droste DW, Babikian VL, Evans DH, Grosset DG, Kaps M, et al. Consensus on microembolus detection by TCD. International Consensus Group on Microembolus Detection. *Stroke*. 1998; 29 (3): 725–9. DOI: 10.1161/01.str.29.3.725. PMID: 9506619.
18. Dmytriw AA, Dibas M, Schirmer CM, et al. North American Neurovascular COVID-19 (NAN-C) Consortium. Age and Acute Ischemic Stroke Outcome in North American Patients With COVID-19. *J Am Heart Assoc*. 2021; 10 (14): 021046.
19. George MG. Risk Factors for Ischemic Stroke in Younger Adults: A Focused Update. *Stroke*. 2020; 51 (3): 729–35. DOI: 10.1161/STROKEAHA.119.024156. Epub 2020 Feb 12. PMID: 32078487; PMCID: PMC7112557.
20. Shaik TA, Haseeb M, Faisal S, et al. Impact of Catheter Ablation on Long-Term Outcomes in Patients With Atrial Fibrillation: A Meta-Analysis. *Cureus*. 2022; 14 (9): e29202. Published 2022 Sep 15. DOI: 10.7759/cureus.29202.
21. Sajeev JK, Kalman JM, Dewey H, Cooke JC, Teh AW. The Atrium and Embolic Stroke: Myopathy Not Atrial Fibrillation as the Requisite Determinant? *JACC Clin Electrophysiol*. 2020; 6 (3): 251–61. DOI: 10.1016/j.jacep.2019.12.013.
22. Kamel H, Soliman EZ, Heckbert SR, Kronmal RA, Longstreth WT Jr, Nazarian S, et al. P-wave morphology and the risk of incident ischemic stroke in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Stroke*. 2014; 45 (9): 2786–8.
23. Keach JW, Bradley SM, Turakhia MP, Maddox TM. Early detection of occult atrial fibrillation and stroke prevention. *Heart*. 2015; 101 (14): 1097–102.
24. Ronsoni RM, Saffi MAL, Gonçalves MVM, Nakayama IH, Luz Leiria TL. A New Vision at the Interface of Atrial Fibrillation and Stroke. *Front Cardiovasc Med*. 2021; 8: 689313. Published 2021 Aug 9. DOI: 10.3389/fcvm.2021.689313.
25. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993; 24 (1): 35–41. DOI: 10.1161/01.str.24.1.35. PMID: 7678184.
26. Park JH, Chung JW, Bang OY, et al. Atherosclerotic Burden and Vascular Risk in Stroke Patients With Atrial Fibrillation. *Stroke*. 2021; 52 (5): 1662–72.

## НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ И МОНОЦИТАРНЫЕ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ В ДИАГНОСТИКЕ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА

Ж. М. Салмаси, Г. В. Порядин, М. И. Панина, В. Н. Ларина, А. А. Рыжих, Е. А. Стоделова, А. Н. Казимирский 

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

Постковидный синдром характеризуется когнитивными и психическими нарушениями, болями в груди и суставах, нарушениями обоняния и вкуса, а также желудочно-кишечными и сердечными расстройствами. Диагностика постковидного синдрома основывается преимущественно на жалобах больных. В настоящее время оптимального метода диагностики не предложено. Целью исследования было сравнить информативность показателей, полученных при традиционном обследовании больных с постковидным синдромом, с уровнем в крови нейтрофильных (НЭЛ) и моноцитарных (МЭЛ) экстраклеточных ловушек. Исследовали нейтрофилы и моноциты, полученные от 21 больного в возрасте 18–59 лет с диагнозом постковидный синдром. Для визуализации и подсчета экстраклеточных ловушек использовали метод флуоресцентной микроскопии с применением флуоресцентного красителя для двухцепочечной ДНК SYBR Green (Evrogen). Клинико-лабораторные показатели не позволяют выявить специфические для постковидного синдрома изменения. Вместе с тем, постковидный синдром характеризуется воспалительным процессом в сосудистом эндотелии. Лабораторным признаком такого асептического воспаления служат найденные нами в крови НЭЛ в нитевидной форме. Нитевидные структуры НЭЛ обнаружены только у тех больных, которые перенесли COVID-19 в легкой и среднетяжелой форме. А у больных, перенесших эту инфекцию в тяжелой форме, найдены нитевидные МЭЛ. Результаты исследования демонстрируют, что наиболее информативным диагностическим признаком постковидного синдрома является обнаружение в крови НЭЛ и МЭЛ в нитевидной форме.

**Ключевые слова:** постковидный синдром, диагностика, нейтрофильные экстраклеточные ловушки, моноцитарные экстраклеточные ловушки, нитевидные формы

**Благодарности:** авторы благодарят за активное сотрудничество всех участвовавших в исследовании пациентов и выражают признательность врачам и медицинским сестрам Диагностического клинического центра № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы.

**Вклад авторов:** Г. В. Порядин, В. Н. Ларина — концепция и дизайн исследования; А. А. Рыжих, Е. А. Стоделова — сбор и обработка материала; Е. А. Стоделова, А. Н. Казимирский — экспериментальные исследования, подготовка иллюстративного материала; М. И. Панина — статистическая обработка материала; А. Н. Казимирский — написание текста; Ж. М. Салмаси, М. И. Панина — редактирование.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 203 от 21 декабря 2021 г.); все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

 **Для корреспонденции:** Александр Николаевич Казимирский  
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; alnica10@mail.ru

**Статья получена:** 29.10.2022 **Статья принята к печати:** 25.11.2022 **Опубликована онлайн:** 09.12.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.057

## NEUTROPHIL AND MONOCYTE EXTRACELLULAR TRAPS IN THE DIAGNOSIS OF POST-COVID SYNDROME

Salmasi JM, Poryadin GV, Panina MI, Larina VN, Ryzhikh AA, Stodelova EA, Kazimirsii AN 

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia


Post-COVID syndrome (long covid, post COVID-19 condition) is characterized by cognitive and mental disorders, chest and joint pain, impaired sense of smell and taste, as well as by gastrointestinal and cardiac disorders. The diagnosis of post-COVID syndrome is based mainly on the patients' complaints. To date, no optimal diagnostic method has been proposed. The study was aimed to compare the informative value of the indicators obtained during conventional assessment of patients with post-COVID syndrome and the blood levels of neutrophil (NETs) and monocyte (METs) extracellular traps. The study involved neutrophils and monocytes collected from 21 patients with post-COVID syndrome aged 18–59. Fluorescence microscopy and the SYBR Green (Evrogen) fluorescent dye for double-stranded DNA were used for enumeration and imaging of extracellular traps. Clinical and laboratory indicators make it impossible to identify the changes specific for post-COVID syndrome. At the same time, post-COVID syndrome is characterized by inflammation in the vascular endothelium. The filamentous forms of NETs found in blood are a laboratory feature of such aseptic inflammation. The filamentous forms of NETs have been detected only in those patients who have a history of mild to severe COVID-19, while the filamentous forms of METs have been found in patients having a history of severe infection. The findings show that the detection of the filamentous forms of NETs and METs in blood is the most informative diagnostic feature of post-COVID syndrome.

**Keywords:** post-COVID syndrome, diagnosis, neutrophil extracellular traps, monocyte extracellular traps, filamentous forms

**Acknowledgements:** the authors express their gratitude to all the patients enrolled for their active cooperation and thank the physicians and nurses at the Diagnostic Clinical Center No. 1 of the Moscow Department of Health.

**Author contribution:** Poryadin GV, Larina VN — study concept and design; Ryzhikh AA, Stodelova EA — data acquisition and processing; Stodelova EA, Kazimirsii AN — experimental studies, preparation of illustrations; Panina MI — statistical data processing; Kazimirsii AN — manuscript writing; Salmasi JM, Panina MI — editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee at the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 203 of 21 December 2021); all patients submitted the informed consent to study participation.

 **Correspondence should be addressed:** Alexander N. Kazimirsii  
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; alnica10@mail.ru

**Received:** 29.10.2022 **Accepted:** 25.11.2022 **Published online:** 09.12.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.057



Постковидный синдром (постковид, лонг-ковид, Post COVID-19 condition) — это новое малоизученное патологическое состояние. Несмотря на то что точное определение постковидного синдрома отсутствует, наиболее распространенными симптомами, согласно результатам многих исследований, являются слабость и одышка, длящиеся в течение нескольких месяцев после острого COVID-19 [1]. К другим хроническим проявлениям постковида относят когнитивные и психические нарушения, боли в груди и суставах, сердцебиение, миалгию, нарушения обоняния и вкуса, кашель, головную боль, а также желудочно-кишечные расстройства и нарушения сердечно-сосудистой системы [2]. Патогенез постковидного синдрома связан с повреждением большого количества различных клеток и органов, что проявляется целым набором симптомов. Долгосрочные симптомы возникают у пациентов, перенесших COVID-19 и в легкой, и в тяжелой форме. Симптомы перенесенного COVID-19 разнообразны, но их систематизации нет.

Чаще всего постковидный синдром постепенно регрессирует в течение полугода, но у некоторых больных длительное время сохраняются полиорганные нарушения и развиваются осложнения. Диагностика постковидного синдрома субъективна и основана на жалобах больных.

Наиболее часто у большинства больных с самой разнообразной симптоматикой можно наблюдать нарушения в системе гемостаза. Лабораторным подтверждением патологии гемостаза при постковиде служит тест определения D-димера — продукта распада фибрина-полимера, который образуется при ферментативном гидролизе белкового каркаса тромба [3, 4]. Однако D-димер в высоких концентрациях обнаруживают не у всех больных, поэтому он не может служить полноценным и единственным маркером постковидного синдрома. В настоящее время оптимального метода диагностики, позволяющего выявить информативные патогенетически значимые диагностические критерии постковидного синдрома, не предложено.

В связи с тем, что патогенез постковидного синдрома связан с повреждением клеток, приводящим к развитию воспалительного процесса, было высказано предположение об изменении функциональной активности ведущих клеток воспаления — нейтрофилов и моноцитов. Одним из проявлений участия этих клеток в воспалительном процессе служит образование экстраклеточных ловушек.

Цель исследования состояла в сравнении информативности показателей, полученных при традиционном клинико-лабораторном обследовании больных с постковидным синдромом, с результатами определения в крови нейтрофильных и моноцитарных экстраклеточных ловушек.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование был включен 21 амбулаторный пациент в возрасте 18–59 лет (36 [27–50]). Критерий включения: диагноз постковидный синдром. Группу сравнения (контроль) составили 20 здоровых доноров в возрасте 18–59 лет (38,5 [29–51,5]) без перенесенной коронавирусной инфекции.

Биохимические показатели крови больных и здоровых доноров определяли на автоматическом биохимическом анализаторе Olympus 5800 (JP, Olympus Corporation; США) на базе клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ Москвы «ДКЦ № 1 ДЗМ». Исследование проводили

в лаборатории кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Минздрава России. Все процедуры выполняли в соответствии с принятыми этическими нормами. Помимо традиционных клинико-лабораторных исследований в работе были использованы новые лабораторные методы: определение нейтрофильных и моноцитарных экстраклеточных ловушек.

## Определение содержания нейтрофильных и моноцитарных экстраклеточных ловушек. Получение клеточных фракций

### Выделение нейтрофилов и моноцитов

Венозную кровь пациентов помещали в силиконизированную пробирку с ЭДТА для предотвращения свертывания. Для выделения нейтрофилов и моноцитов из венозной крови, обработанной ЭДТА, кровь разводили в 2 раза натрий-фосфатным буферным раствором, pH 7,4, и наслаивали на двойной градиент плотности фикола-верографина. Плотность верхнего слоя градиента составляет 1,077 г/см<sup>3</sup>, а нижнего — 1,190 г/см<sup>3</sup>. После центрифугирования (1600 об./мин, 30 мин) на границе между градиентами возникает скопление нейтрофилов с чистотой 98–100%, а на поверхности верхнего слоя градиента (1,077) появляется кольцо моноцитов.

Нейтрофилы и моноциты дважды отмывали от примесей фикола натрий-фосфатным буферным раствором (50 мМ, pH 7,4). Осаждение клеток крови проводили при центрифугировании (1200 об./мин, 15 мин). Выделенные нейтрофилы и моноциты в среде RPMI-1640 использовали в экспериментах по культивированию. Жизнеспособность выделенных нейтрофилов и моноцитов составляла 95 и 99% соответственно.

### Иммунофлюоресцентное определение нейтрофильных и моноцитарных экстраклеточных ловушек

Для обнаружения и подсчета нейтрофильных и моноцитарных экстраклеточных ловушек использовали флюоресцентную микроскопию. Методика подробно представлена в заявке на Патент РФ № 2021104936/14(010852).

Результаты выражали в процентах, в виде отношения количества экстраклеточных ловушек к общему числу клеток в поле зрения.

Выявление нейтрофильных и моноцитарных экстраклеточных ловушек осуществляли с использованием флюоресцентного красителя SYBR Green (Evrogen; Россия), специфично взаимодействующего с двухцепочечной ДНК. Подсчет и фоторегистрацию клеток и экстраклеточных структур проводили при увеличении  $\times 700$ .

## Статистическая обработка

Для статистической обработки данных использовали пакет программ STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc.; США). Результаты представляли с помощью среднего значения (M) и стандартной ошибки (m), при распределении, отличающемся от нормального, — в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го перцентилей распределения значений показателя (межквартильный размах). Количественные признаки сравнивали с использованием рангового U-критерия Манна–Уитни и дисперсионного анализа

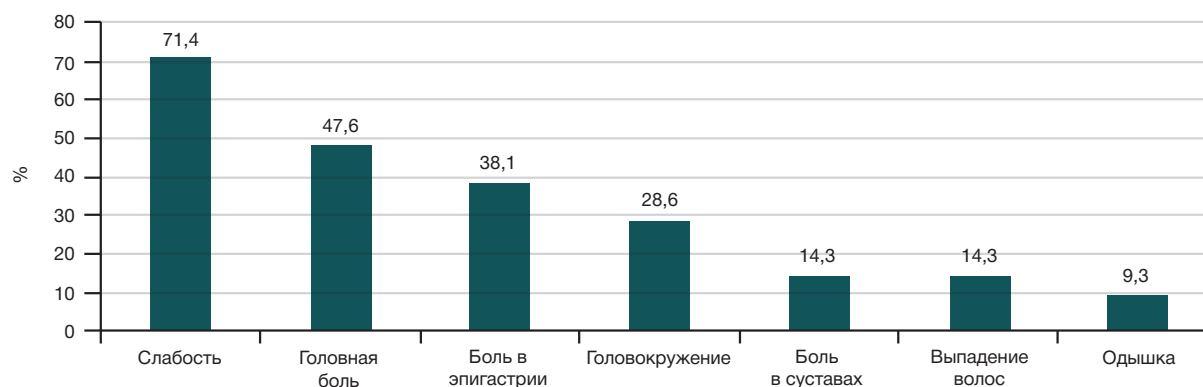


Рис. 1. Встречаемость симптомов у больных с постковидным синдромом к 95-му [89–109] дню от начала заболевания

Краскела–Уоллиса. Различия считали статистически значимым при значении  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичный осмотр пациентов основной группы проводили в период с 60 до 119 дня от начала болезни, т. е. спустя 95 [89–109] дней, или 13,6 недель. Возраст больных с

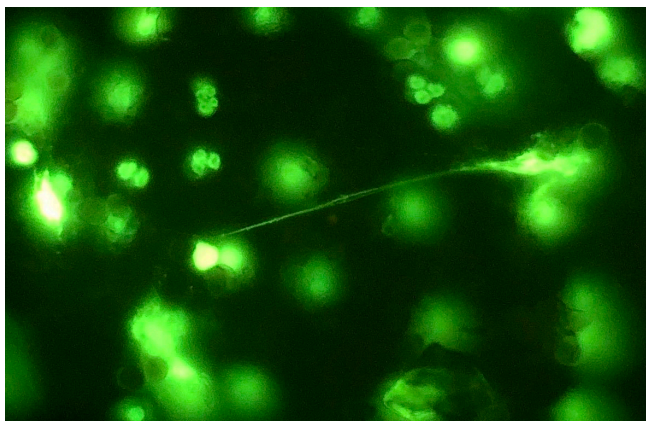
постковидным синдромом составил 36,0 [27,0–50,0] лет, а в группе здоровых доноров — 38,5 [29,0–51,5] лет ( $p = 0,818$ ). Индекс массы тела у больных и здоровых доноров был практически идентичен — 25,0 [22,0–28,7] кг/м<sup>2</sup> и 24,6 [23,3–29,5] кг/м<sup>2</sup> ( $p = 0,783$ ) соответственно.

Легкое течение заболевания в анамнезе имели 11 (52,4%) пациентов, среднетяжелое — 7 (33,3%), тяжелое — 3 (14,3%) пациента. Встречаемость симптомов

Таблица. Лабораторные показатели больных с постковидным синдромом и у здоровых доноров

Показатели	Больные с постковидным синдромом ( $n = 21$ )	Здоровые доноры (контроль) ( $n = 20$ )	Вероятность $p$
	Me [25–75]	Me [25–75]	
Гемоглобин (г/л)	136,0 [127,0–157,0]	133,5 [130,0–147,5]	0,725
Содержание гемоглобина в эритроците (пг)	29,6 [29,0–30,4]	30,7 [30,1–32,0]	0,005
Ширина распределения эритроцитов (%)	13,5 [12,7–14,1]	12,4 [12,1–12,9]	0,015
Эритроциты ( $10^{12}/л$ )	4,7 [4,5–5,1]	4,3 [4,1–4,7]	0,005
Лейкоциты ( $10^9/л$ )	6,2 [5,7–8,1]	5,5 [4,6–6,8]	0,059
Нейтрофилы ( $10^9/л$ )	3,1 [2,5–4,8]	3,3 [2,2–4,4]	0,583
Лимфоциты ( $10^9/л$ )	2,2 [2,0–2,9]	1,8 [1,3–2,1]	0,001
Эозинофилы ( $10^9/л$ )	0,2 [0,1–0,2]	0,1 [0,1–0,2]	0,0007
Тромбоциты ( $10^9/л$ )	264,0 [228,0–316,0]	261,0 [221,0–292,0]	0,464
Лейкопения, $n$ (%)	0	3 (15)	0,179
Нейтропения, $n$ (%)	2 (9,5)	1 (5)	0,965
Дефицит витамина Д, $n$ (%)	7 (33,3)	8 (40)	0,658
Повышение D-димера, $n$ (%)	1 (4,8)	2 (10)	0,706
Скорость оседания эритроцитов (мм/ч)	5,0 [2,0–10,0]	7,5 [3,5–9,5]	0,57
Витамин Д (нг/мл)	17,3 [14,1–23,3]	23,0 [16,9–36,8]	0,211
Железо (мкмоль/л)	14,4 [9,4–22,9]	18,5 [14,5–24,6]	0,25
Ферритин (нг/мл)	35,4 [17,1–105,4]	97,3 [43,5–191,5]	0,229
Аланинаминотрансфераза (ЕД/л)	25,8 [16,0–43,0]	15,5 [13,0–21,0]	0,007
Аспартатаминотрансфераза (ЕД/л)	22,0 [20,5–27,4]	19,0 [16,0–22,0]	0,028
Гаммаглутамилтранспептидаза (ЕД/л)	33,0 [33,0–51,8]	15,5 [11,5–30,5]	0,031
Щелочная фосфатаза (ЕД/л)	213,5 [128,9–834,0]	58,0 [53,0–76,5]	0,018
Холестерин (ммоль/л)	5,3 [4,6–5,9]	5,4 [5,1–5,9]	0,612
Липопротеиды низкой плотности (ммоль/л)	3,4 [2,3–3,5]	3,1 [2,6–3,8]	0,719
Калий (ммоль/л)	4,7 [4,4–4,9]	5,0 [4,6–5,1]	0,328
Мочевая кислота (ммоль/л)	332,0 [277,0–465,0]	285,0 [213,5–345,5]	0,114
Мочевина (ммоль/л)	4,7 [3,9–6,6]	4,0 [3,5–5,1]	0,116
Креатинин (ммоль/л)	75,5 [64,5–80,5]	70,0 [54,0–82,5]	0,292
Тиреотропный гормон (мМЕ/л)	1,5 [1,1–1,8]	2,0 [1,2–2,7]	0,177
Глюкоза (ммоль/л)	5,2 [5,1–5,8]	4,6 [4,4–4,8]	0,0007
Д-димер (мкг/л)	235,0 [190,0–300,0]	247,5 [192,0–361,5]	0,831

Примечание: Me — медиана показателя; [25–75] — межквартильный размах.



**Рис. 2.** Нейтрофильные экстраклеточные ловушки у больных с постковидным синдромом в форме одиночных волокон ДНК, выходящих из ядра нейтрофила

COVID-19 к 95-му [89–109] дню болезни представлена на рис. 1. В среднем один пациент имел 1–6 симптомов ( $2,4 \pm 1,1$ ).

У обследованных нами больных с постковидным синдромом чаще всего возникали слабость, головная боль, боль в эпигастрии и головокружение (рис. 1). Реже больные жаловались на выпадение волос и одышку. В других работах по исследованию симптоматики больных с постковидным синдромом наиболее часто были зарегистрированы слабость, миалгии, головные боли и симптомы вегетативных нарушений. Можно предположить, что такая клиническая картина наиболее характерна для постковидного синдрома. Симптомокомплекс не требует специфического лечения и, возможно, обусловлен микроангиопатиями и повреждением эндотелия сосудов.

Лабораторные показатели больных с постковидным синдромом в сравнении с показателями здоровых доноров представлены в таблице.

Таким образом, у больных с постковидным синдромом, по сравнению с группой контроля, обнаружены некоторое относительное увеличение количества эритроцитов, лимфоцитов и эозинофилов в периферической крови, повышение активности печеночных ферментов, увеличение концентрации глюкозы в плазме крови. Несмотря на то что изменения показателей больных не выходили за пределы референсных значений, они явно не случайны. На наш взгляд, относительное увеличение количества эритроцитов в крови больных, перенесших COVID-19, связано с гипоксией, сопутствовавшей заболеванию.

Увеличение активности трансаминаз и повышение уровня глюкозы в крови могут быть связаны с умеренным поражением гепатоцитов.

Подтверждением этого предположения является и факт повышения активности ферментов гаммаглутамилтранспептидазы и щелочной фосфатазы. Наблюдаемое умеренное повышение содержания в крови эозинофилов и лимфоцитов, на наш взгляд, отражает истощение гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в процессе перенесения COVID-19, что приводит к некоторому снижению концентрации кортизола в крови обследованных пациентов. Уровень D-димера у них практически не изменен, что объясняется отсутствием или слабо выраженным процессом тромбообразования.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клинико-лабораторные показатели, представленные в таблице, в целом не позволяют выявить характерные



**Рис. 3.** Моноцитарные экстраклеточные ловушки у больных с постковидным синдромом в форме одиночных волокон ДНК, выходящих из ядра клетки

для постковидного синдрома специфические изменения. Вместе с тем известно, что для постковидного синдрома характерен выраженный воспалительный процесс в сосудах эндотелии [5]. Лабораторным признаком такого асептического воспаления служит выявление в крови нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) в нитевидной форме [6]. Примечательно, что эти нитевидные структуры выявляются только у тех больных, которые перенесли заболевание в легкой и среднетяжелой форме (рис. 2). У переболевших в легкой форме количество НЭЛ составило  $6,55 \pm 0,94\%$  ( $p < 0,05$ ), в среднетяжелой форме —  $0,86 \pm 0,51\%$  ( $p < 0,05$ ). МЭЛ у больных этих групп не обнаружены.

У больных, перенесших COVID-19 в тяжелой форме, НЭЛ не были выявлены. Тем не менее, продукты деградации ДНК — внеклеточные пуриновые азотистые основания найдены и у больных, переболевших в тяжелой форме [7]. Мы предположили наличие, а затем и обнаружили у таких больных МЭЛ в нитевидной форме (рис. 3). Содержание МЭЛ у этих больных было невысоким и составило  $1,01 \pm 0,71\%$  ( $p < 0,05$ ).

Ферментативная деградация волокон ДНК вызывает появление факторов вторичной альтерации — внеклеточных пуриновых азотистых оснований, способных повреждать клетки центральной нервной системы (ЦНС) и внутренних органов и поддерживать, таким образом, асептическое воспаление. Причем у больных с постковидным синдромом экстраклеточные ловушки в нитевидной форме и увеличенное количество внеклеточных пуриновых азотистых оснований регистрировали на протяжении продолжительного времени (три месяца и более). Мы полагаем, что повышенное количество внеклеточных пуриновых азотистых оснований — это наиболее существенный фактор патогенеза постковидного синдрома, который необходимо ограничивать, чтобы избежать повреждения эндотелия, клеток ЦНС и внутренних органов. Источником этих повреждающих молекул (факторов вторичной альтерации) служат нитевидные структуры, происходящие из нейтрофилов и моноцитов. Следовательно, эффективная терапия должна быть направлена на ограничение формирования нейтрофильных и моноцитарных экстраклеточных ловушек у больных с постковидным синдромом.

В настоящее время продуцируемые нейтрофилами экстраклеточные структуры (НЭЛ) большинство исследователей определяют как сетевидные и считают, что нейтрофилы формируют только эти сетевидные образования. Однако это не так. Мы впервые выявили

зависимость морфологии нейтрофильных экстраклеточных ловушек от вида воспаления и нашли, что НЭЛ в нитевидной форме характерны только для асептического воспаления [6]. А сетевидные НЭЛ возникают только при благоприятном течении инфекционного воспалительного процесса [6]. Сетевидная структура НЭЛ имеет особое физиологическое значение, поскольку она функционально активна. Волокна такой сети захватывают патогены и гибнущие инфицированные клетки организма, а затем осуществляют ретракцию [8]. Моноциты/макрофаги поглощают и гидролизуют сеть вместе с патогенами и остатками погибших клеток организма. НЭЛ в нитевидной форме не способны к такой реакции и служат источником факторов вторичной альтерации — внеклеточных пуриновых азотистых оснований. Более того, действие аденина, высвобождающегося в больших количествах при ферментативном гидролизе волокон ДНК, ингибирует активность Т-лимфоцитов и может вызвать формирование вторичного иммунодефицита. По результатам настоящего

исследования можно сделать заключение, что наиболее характерным информативным диагностическим признаком постковидного синдрома является обнаружение в крови нейтрофильных и моноцитарных ловушек в нитевидной форме.

## ВЫВОДЫ

Диагностическим признаком постковидного синдрома являются нейтрофильные и моноцитарные экстраклеточные ловушки в нитевидной форме. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в нитевидной форме обнаружены у больных с постковидным синдромом, перенесших COVID-19 в легкой и среднетяжелой формах. У больных с постковидным синдромом, переболевших в тяжелой форме, нейтрофильные экстраклеточные ловушки не были обнаружены, но в крови присутствуют моноцитарные экстраклеточные ловушки в нитевидной форме.

## Литература

1. Yong SJ. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. *Infect Dis (Lond)*. 2021; 53 (10): 737–54. DOI: 10.1080/23744235.2021.1924397.
2. Tirelli U, Taibi R, Chirumbolo S. Post COVID syndrome: a new challenge for medicine. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021; 25 (12): 4422–5. DOI: 10.26355/eurrev\_202106\_26154.
3. Song X, Ji J, Reva B, Joshi H, Calinawan AP, Mazumdar M, Wisnivesky JP, et al. Post-anticoagulant D-dimer is a highly prognostic biomarker of COVID-19 mortality. *ERJ open research*. 2021; 7 (3): 18. DOI: 10.1183/23120541.00018-2021.
4. Townsend L, Fogarty H, Dyer A, Martin-Loeches I, Bannan C, Nadarajan P, et al. Prolonged elevation of D-dimer levels in convalescent COVID-19 patients is independent of the acute phase response. *J Thromb Haemost*. 2021; 19 (4): 1064–70. DOI: 10.1111/jth.15267.
5. Ostergaard L. SARS CoV-2 related microvascular damage and symptoms during and after COVID-19: Consequences of capillary transit-time changes, tissue hypoxia and inflammation. *Physiol Rep*. 2021; 9 (3): e14726. DOI: 10.14814/phy2.14726.
6. Казимирский А. Н., Салмаси Ж. М., Порядин Г. В., Панина М. И. Новые возможности диагностики и исследования патогенеза различных видов воспаления. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2022; 66 (2): 34–42. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.34-42.
7. Казимирский А. Н., Салмаси Ж. М., Порядин Г. В., Панина М. И., Ларина В. Н., Рыжих А. А. Постковидный синдром ассоциирован с повышением внеклеточных пуриновых оснований и нейтрофильных экстраклеточных ловушек в плазме крови. Бюллетень сибирской медицины. 2022; 21 (2): 41–47. DOI: 10.20538/1682-0363-2022-2-41-47.
8. Кулес И. В., Салмаси Ж. М., Терновой К. С., Казимирский А. Н., Ободзинская Т. Е., Лим В. Г., и др. Предпосылки к созданию атласа постковидного воспаления как способа персонализированной фармакотерапии, а также прогнозирования и предупреждения органных и системных дисфункций. Медицинский Совет. 2021; (12): 72–88. DOI: 10.21518/2079-701X-2021-12-72-88.

## References

1. Yong SJ. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. *Infect Dis (Lond)*. 2021; 53 (10): 737–54. DOI: 10.1080/23744235.2021.1924397.
2. Tirelli U, Taibi R, Chirumbolo S. Post COVID syndrome: a new challenge for medicine. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021; 25 (12): 4422–5. DOI: 10.26355/eurrev\_202106\_26154.
3. Song X, Ji J, Reva B, Joshi H, Calinawan AP, Mazumdar M, Wisnivesky JP, et al. Post-anticoagulant D-dimer is a highly prognostic biomarker of COVID-19 mortality. *ERJ open research*. 2021; 7 (3): 18. DOI: 10.1183/23120541.00018-2021.
4. Townsend L, Fogarty H, Dyer A, Martin-Loeches I, Bannan C, Nadarajan P, et al. Prolonged elevation of D-dimer levels in convalescent COVID-19 patients is independent of the acute phase response. *J Thromb Haemost*. 2021; 19 (4): 1064–70. DOI: 10.1111/jth.15267.
5. Ostergaard L. SARS CoV-2 related microvascular damage and symptoms during and after COVID-19: Consequences of capillary transit-time changes, tissue hypoxia and inflammation. *Physiol Rep*. 2021; 9 (3): e14726. DOI: 10.14814/phy2.14726.
6. Kazimirskii AN, Salmasi JM, Poryadin GV, Panina MI. Novye vozmozhnosti diagnostiki i issledovaniya patogeneza razlichnykh vidov vospaleniya. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimental'naya terapiya*. 2022; 66 (2): 34–42. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.34-42. Russian.
7. Kazimirskii AN, Salmasi JM, Poryadin GV, Panina MI, Larina VN, Ryzhikh AA. Postkovidnyy sindrom associirovan s povysheniem vnekletochnykh purinovykh osnovanij i nejtrofil'nykh ehkstrakletochnykh lovushek v plazme krovi. *Byulleten' sibirskoj mediciny*. 2022; 21 (2): 41–47. DOI: 10.20538/1682-0363-2022-2-41-47. Russian.
8. Kukes IV, Salmasi JM, Ternovoy KS, Kazimirskii AN, Obodzinskaya TE, Lim VG, i dr. Predposylki k sozdaniyu atlasa postkovidnogo vospaleniya kak sposoba personalizirovannoj farmakoterapii, a takzhe prognozirovaniya i preduprezhdeniya organnykh i sistemnykh disfunkcij. *Medicinskij Sovet*. 2021; (12): 72–88. DOI: 10.21518/2079-701X-2021-12-72-88. Russian.



# АЛГОРИТМ СЕГМЕНТАЦИИ ОКТ-ИЗОБРАЖЕНИЙ МАКУЛЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ПАЦИЕНТОВ С ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ

Р. Р. Ибрагимова<sup>1</sup>✉, И. И. Гильманов<sup>2</sup>, Е. А. Лопухова<sup>2</sup>, И. А. Лакман<sup>1,2</sup>, А. Р. Билялов<sup>1</sup>, Т. Р. Мухаммадеев<sup>1,3</sup>, Р. В. Кутлугаров<sup>2</sup>, Г. М. Идрисова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

<sup>2</sup> Уфимский государственный авиационный технический университет, Уфа, Россия

<sup>3</sup> Закрытое акционерное общество «Оптимедсервис», Уфа, Россия

Одной из основных причин слепоты и слабовидения у лиц старшего трудоспособного возраста является возрастная макулярная дегенерация (ВМД), для диагностики которой крайне важны результаты оптической когерентной томографии (ОКТ). Создание рекомендательной системы для анализа ОКТ-снимков позволит сократить время на обработку визуальной информации и снизить вероятность ошибок в процессе работы врача. Целью исследования было разработать алгоритм сегментации для анализа данных ОКТ макулы пациентов с ВМД, позволяющий, основываясь на форме выделенных патологий, корректно предсказывать стадию развития ВМД. Разработана программа на языке программирования Python с использованием библиотеки PyTorch и TensorFlow. Качество работы программы оценили на ОКТ-изображениях макулы 51 пациента с ВМД ранней, промежуточной и поздней стадией. Разработан алгоритм сегментации ОКТ-снимков, основанный на сверточной нейронной сети. В качестве архитектуры сверточной нейронной сети была выбрана сеть UNet. Нейронная сеть обучена на ОКТ-снимках макулы 125 пациентов (197 глаз). Авторский алгоритм продемонстрировал 98,1% верно сегментированных областей на ОКТ-снимках, наиболее важных для диагностики и определения стадии ВМД. Взвешенная чувствительность и специфичность классификатора стадий ВМД составили соответственно 83,8% и 84,9%. Разработанный алгоритм перспективен в качестве рекомендательной системы, реализующей классификацию ВМД на основе данных, способствующей принятию решений о тактике лечения пациентов.

**Ключевые слова:** искусственный интеллект, нейронная сеть, возрастная макулярная дегенерация, оптическая когерентная томография, алгоритм машинного обучения

**Финансирование:** исследование частично выполнено в рамках работ по государственному заданию Минобрнауки России для ФГБОУ ВО «УГАТУ» (код научной темы #FEUE-2021-0013, соглашение № 075-03-2021-014) в молодежной научно-исследовательской лаборатории НОЦ «Сенсорные системы на основе устройств интегральной фотоники» (разделы «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов»), а также в рамках проекта, поддержанного субсидией в области науки из бюджета Республики Башкортостан для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых (НОЦ-ПМГ-2021, соглашение с ФГБОУ ВО «УГАТУ») (раздел «Введение»).

**Вклад авторов:** Р. Р. Ибрагимова — обзор литературы, получение и анализ данных, написание статьи; И. И. Гильманов — разработка программного обеспечения, поиск базы данных, тестирование существующих компонентов кода; Е. А. Лопухова — разработка программного обеспечения, написание статьи, получение и анализ данных; И. А. Лакман, Т. Р. Мухаммадеев, Р. В. Кутлугаров — концепция и дизайн исследования, научное редактирование; А. Р. Билялов — научное редактирование; Г. М. Идрисова — анализ данных, научное редактирование.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации; все пациенты подписали добровольное информированное согласие на проведение ОКТ.

✉ Для корреспонденции: Рада Радиковна Ибрагимова  
ул. Ленина, д. 3, г. Уфа, 450008, Россия; ibragimova.rada2016@yandex.ru

Статья получена: 03.11.2022 Статья принята к печати: 03.12.2022 Опубликована онлайн: 27.12.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.062

## ALGORITHM OF SEGMENTATION OF OCT MACULAR IMAGES TO ANALYZE THE RESULTS IN PATIENTS WITH AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION

Ibragimova RR<sup>1</sup>✉, Gilmanov II<sup>2</sup>, Lopukhova EA<sup>2</sup>, Lakman IA<sup>1,2</sup>, Bilyalov AR<sup>1</sup>, Mukhamadeev TR<sup>1,3</sup>, Kutluyarov RV<sup>2</sup>, Idrisova GM<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

<sup>2</sup> Ufa State Aviation Technical University, Ufa, Russia

<sup>3</sup> Optimedservice, Ufa, Russia

Age-related macular degeneration (AMD) is one of the main causes of loss of sight and hypovision in people over working age. Results of optical coherence tomography (OCT) are essential for diagnostics of the disease. Developing the recommendation system to analyze OCT images will reduce the time to process visual data and decrease the probability of errors while working as a doctor. The purpose of the study was to develop an algorithm of segmentation to analyze the results of macular OCT in patients with AMD. It allows to provide a correct prediction of an AMD stage based on the form of discovered pathologies. A program has been developed in the Python programming language using the Pytorch and TensorFlow libraries. Its quality was estimated using OCT macular images of 51 patients with early, intermediate, late AMD. A segmentation algorithm of OCT images was developed based on convolutional neural network. UNet network was selected as architecture of high-accuracy neural net. The neural net is trained on macular OCT images of 125 patients (197 eyes). The author algorithm displayed 98.1% of properly segmented areas on OCT images, which are the most essential for diagnostics and determination of an AMD stage. Weighted sensitivity and specificity of AMD stage classifier amounted to 83.8% and 84.9% respectively. The developed algorithm is promising as a recommendation system that implements the AMD classification based on data that promote taking decisions regarding the treatment strategy.

**Keywords:** artificial intelligence, neural network, age-related macular degeneration, optical coherent tomography, machine learning algorithm

**Financing:** the study was partially conducted as part of the State Assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation for the Ufa State Aviation Technical University (code of scientific assignment #FEUE-2021-0013, agreement № 075-03-2021-014) at the scientific research laboratory named 'Sensor systems based on appliances of integrated photonics' (sections 'Materials and methods', 'Study results', 'Discussion of results') and as part of the project backed by subsidies in the area of science taken from the budget of the Republic of Bashkortostan to ensure state support of scientific research conducted under the guidance of the leading scientists (НОЦ-ПМГ-2021, agreement with the Ufa State Aviation Technical University) (Introduction section).

**Author contribution:** Ibragimova RR — review of literature, data acquisition and analysis, writing an article; Gilmanov II — development of software, searching a database, testing the existing code components; Lopukhova EA — development of software, writing an article, data acquisition and analysis; Lakman IA, Mukhamadeev TR, Kutluyarov RV — study concept and design, scientific editing; Bilyalov AR — scientific editing; Idrisova GM — data analysis, scientific editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was performed in accordance with the principles of Declaration of Helsinki; all patients signed voluntary informed consent to OCT.

✉ Correspondence should be addressed: Rada R. Ibragimova  
Lenina, d. 3, Ufa, 450008, Russia; ibragimova.rada2016@yandex.ru

Received: 03.11.2022 Accepted: 03.12.2022 Published online: 27.12.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.062

Одной из основных причин слепоты и слабовидения среди людей в возрасте 50 лет и старше является возрастная макулярная дегенерация (ВМД) [1–3]. В связи с увеличением продолжительности жизни населения и совершенствованием методов диагностики отмечается ежегодный рост количества пациентов с данной патологией [4, 5]. Так, согласно прогнозам Всемирной организации здравоохранения, число людей с ВМД в период с 2020 по 2030 г. увеличится в 1,2 раза (с 195,6 до 243,3 млн человек) [6].

Существуют различные классификации ВМД: в отечественной практике принято различать сухую (неэкссудативную, в поздней стадии — атрофическую) и влажную (экссудативную или неоваскулярную) формы ВМД [7, 8]. Согласно Age-Related Eye Disease Study (AREDS), выделяют раннюю, промежуточную, позднюю стадии возрастной макулярной дегенерации [9]. По данным литературы, в 10–20% случаев неэкссудативная форма заболевания переходит в экссудативную, в остальных случаях имеет медленно прогрессирующее течение и приводит к географической атрофии [10–12]. На сегодняшний день специфического лечения сухой формы ВМД не существует, основное внимание уделяется мерам профилактики [13]. Влажная форма ВМД приводит к быстрой и необратимой потере центрального зрения. Добиться улучшения зрения и снизить вероятность слепоты при влажной форме ВМД позволило внедрение в лечебную практику интравитреальных инъекций ингибиторов сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) [14]. Однако успех лечения зависит от многих факторов, один из которых — своевременная диагностика заболевания [3]. Наиболее широкое использование, как в клинических исследованиях, так и в реальной практике для диагностики и наблюдения за пациентами с ВМД получила оптическая когерентная томография (ОКТ) [15–16]. Она высокоинформативна, бесконтактна, позволяет в режиме реального времени оценить архитектуру структур глаза, в частности, сетчатки [17]. В связи с увеличением количества пациентов с данной патологией растет потребность проведения ОКТ-исследований, что требует увеличения пропускной способности медицинских учреждений и повышения качества метода.

Одной из проблем является анализ и интерпретация больших объемов данных [18, 19]. Для ее решения может быть актуальным использование искусственного интеллекта. Искусственный интеллект становится перспективным направлением в диагностике офтальмологических заболеваний [20]. Так, машинное обучение применяют для обнаружения особенностей строения ткани сетчатки для оценки изменений в ее структуре [21], для обнаружения сосудистых сплетений [22] и различных поражений сетчатки, таких как интравитреальные кисты или субретинальная жидкость [23]. В последние годы методы глубокого обучения приобрели популярность в области компьютерного зрения и теперь входят в область анализа изображений сетчатки. Особое признание снискали методы детектирования заболеваний сетчатки на основе выделенных биомаркеров, что позволяет наиболее приближенно имитировать визуальный анализ эксперта и облегчает верификацию классификатора [24–30]. Вместе с тем последние исследования в области интеграции рекомендательных систем в офтальмологии демонстрируют впечатляющие результаты в снижении затрат времени на диагностику и влияния человеческого фактора на процесс работы врачей [31, 32]. Работа

данных систем основывалась на интеллектуальных алгоритмах, подобных представленным ранее, что подтверждает актуальность поиска и разработки новых алгоритмов, способных с высокой чувствительностью и специфичностью определять признаки ВМД разных стадий на ОКТ-снимках.

Цель исследования — разработать алгоритм сегментации для анализа данных ОКТ макулы пациентов с ВМД, позволяющий на основе формы выделенных патологий корректно предсказывать стадию развития ВМД.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для решения поставленной задачи было использовано контролируемое обучение, в рамках которого интеллектуальный алгоритм сопоставляет входные и размеченные экспертом данные, увеличивая свою обобщающую способность для незнакомых примеров. На этапе формирования трех выборок: обучающей, валидационной и тестовой было принято решение использовать в исследовании базу данных, полученную в ходе стандартного офтальмологического обследования и ОКТ макулярной области на приборах Avanti XR (Optovue; США) и REVO NX (Optopol; Польша) в Центре лазерного восстановления зрения «Optimed» (г. Уфа, Россия). Непосредственное формирование набора данных дало возможность регулировать параметры соотношения классов стадий заболевания, половое и возрастное распределение пациентов и сопутствующих заболеваний, а также число выделяемых биомаркеров, что позволило провести анализ результатов работы алгоритма при заранее известных особенностях набора ОКТ-снимков. Входными данными были ОКТ-изображения макулярной области 125 пациентов (197 глаз), из них — 89 женщин и 36 мужчин, средний возраст составил 74,88 года (40–97 лет). Критерии включения в исследование: пациенты с ранней 32%, промежуточной 26% и поздней 42% стадиями ВМД, с достаточной прозрачностью оптических сред. Критерии исключения: наличие диабетической ретинопатии; наличие окклюзионных поражений сосудов сетчатки; пахихориоидальные состояния; наличие патологии витреомакулярного интерфейса; миопическая хориоидальная неоваскуляризация. Полученный набор ОКТ-снимков был разделен на обучающую, валидационную и тестовую выборки, составляющие 80, 10 и 10% соответственно.

Инструментом для разработки алгоритма классификации и форматирования снимков выступал язык программирования Python с использованием библиотеки TensorFlow и Pytorch. Поиск предикторов стадий ВМД был произведен при помощи сверточной нейронной сети, сегментирующей патологии глаза. Принцип работы данной нейронной сети основан на многослойной последовательной свертке изображения с фильтрами, весовые коэффициенты которых подбирают во время обучения алгоритма. Данные фильтры выделяют различные формы и текстуры на изображении подобно принципу работы зрительной коры головного мозга, имеющей небольшие участки клеток, которые чувствительны к конкретным областям поля зрения. В качестве архитектуры сверточной нейронной сети выбрана UNet, изначально созданная для сегментации биомедицинских изображений. Данная архитектура не только реализует постепенное увеличение множества признаков, называемых тензором, характеризующих входное изображение, посредством

четырёх слоев свертки с фильтрами и сжатия в энкодере, но и сохраняет информацию об их локализации на изображении путем «склеивания» с параллельными слоями свертки и применению операций, обратных сжатию в декодере. В качестве функции активации использовали ReLu, позволяющую качественно обучить модель на относительно небольшом количестве входных данных. Для лучших показателей обработки изображения и очищения их от шума была выбрана библиотека OpenCV.

Для решения проблемы переобучения были рассмотрены несколько подходов. Одним из популярных методов в данном контексте является передача обучения, в рамках которого применяемая сеть предварительно обучается на крупном наборе данных [33–35]. Однако стоит учитывать, что выделяемые биомаркеры на ОКТ-снимке в большинстве случаев будут иметь малую корреляцию с сущностями, которые выделяют сети, обученные на распространенных базах данных изображений по типу ImageNet, что потенциально может снизить эффективность метода [36, 37]. Другим подходом снижения вероятности переобучения сети является использование методов концентрации внимания. Для этого структура нейронной сети была дополнена блоком внимания после каждого слоя свертки. Данный блок включал в себя операцию поиска ключевых точек итога процесса работы слоя и увеличение вблизи них значений элементов обрабатываемого сетью тензора в одном случае и метода поиска адаптивного порогового значения элементов тензора во втором.

Процесс классификации на основе сегментированных данных производили путем расчета площади самых крупных выделенных патологий одной природы. Пороговые значения были определены, исходя из выделенных клинических проявлений ВМД по размеру сопутствующих патологий [9].

Оценку корректности классификации стадии ВМД на основе автоматического распознавания снимков ОКТ проводили на основе анализа девятипольной матрицы сопряженности, представляющей из себя матрицу соответствия между фактическими и предсказанными стадиями ВМД — ранней, промежуточной и поздней. Из этой матрицы рассчитывали три четырехпольные матрицы сопряженности, сформированные по принципу предсказания только одной из стадий ВМД. В результате для каждой матрицы рассчитывали показатели специфичности и чувствительности для каждой из стадий ВМД. Здесь под чувствительностью следует понимать долю корректно предсказанных случаев конкретной стадии ВМД, а под специфичностью — долю корректно предсказанных случаев, не относящихся к данной стадии

ВМД. На основании определенных значений рассчитаны взвешенная чувствительность ( $Se_w$ ) и специфичность ( $Sp_w$ ) всего алгоритма классификации:

$$Se_w = \frac{Se_1 n_1 + Se_2 n_2 + Se_3 n_3}{n},$$

$$Sp_w = \frac{Sp_1 n_1 + Sp_2 n_2 + Sp_3 n_3}{n},$$

где  $Se_1$ ,  $Sp_1$  — чувствительность и специфичность распознавания ранней стадии ВМД,  $Se_2$ ,  $Sp_2$  — чувствительность и специфичность распознавания поздней стадии ВМД,  $Se_3$ ,  $Sp_3$  — чувствительность и специфичность распознавания промежуточной стадии ВМД,  $n_1$  — число случаев ранней стадии ВМД,  $n_2$  — число случаев поздней стадии ВМД,  $n_3$  — число случаев промежуточной стадии ВМД, причем  $n = n_1 + n_2 + n_3$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для разработки рекомендательной системы определения стадий ВМД был выбран подход имитации визуального анализа эксперта, в ходе которого происходят выделение положения и формы патологий заболевания на ОКТ-снимке и сравнение с предыдущим опытом диагностирования. На этапе выделения патологий ключевой проблемой для данного подхода является передача опыта эксперта их различения интеллектуальному алгоритму. Поскольку применение методов глубокого обучения показывает свою эффективность и устойчивость к разнообразию представления входной информации только при достаточном объеме обучающей выборки, пропорциональном сложности алгоритма [38], необходим соответствующий набор размеченных ОКТ-снимков, генерация которого представляется крайне ресурсоемкой задачей. Для нивелирования данного ограничения в структуру сегментирующей нейронной сети UNet было решено включить блок дополнительной обработки набора признаков с выхода слоев свертки, призванный сохранить информацию о контурах патологий, что может быть сведено к задаче концентрации внимания нейронной сети. Представленный подход позволяет снизить сложность применяемого нейросетевого алгоритма, уменьшив число обучаемых параметров при сохранении точности на тренировочной выборке. Оценка эффективности применения такого подхода концентрации внимания была осуществлена путем сравнения точности определения границ патологий сегментированных областей патологий на тестовых данных и анализа карт активации класса

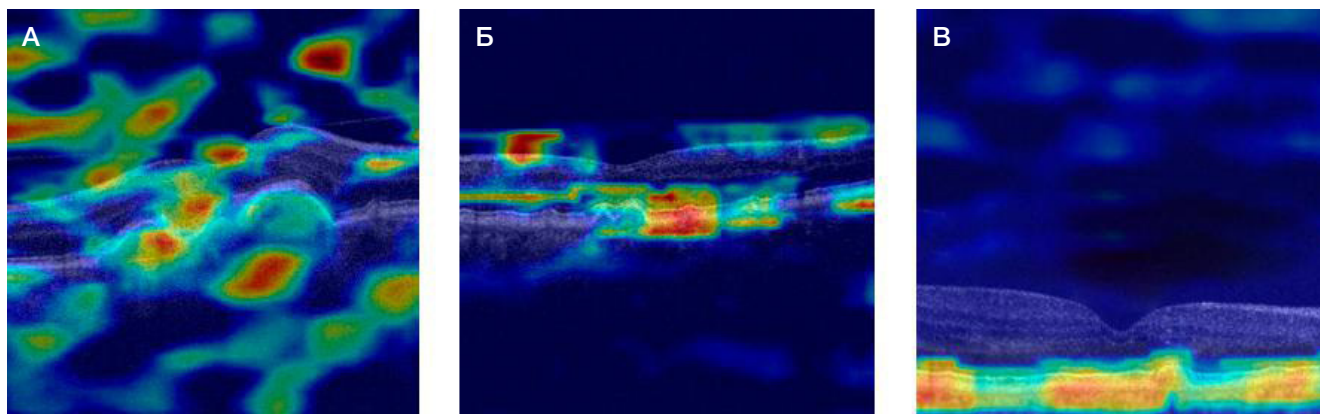
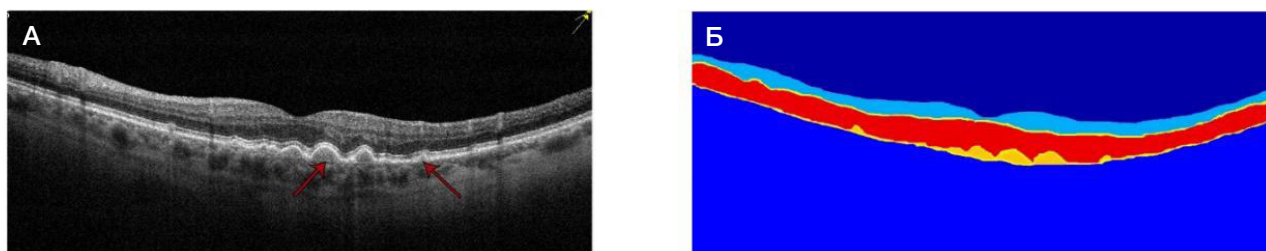


Рис. 1. Карты активации классов: без применения модуля концентрации внимания (А); при применении метода SIFT (Б); при применении метода ПАПЗ (В)





**Рис. 2.** ОКТ-снимки макулярной области при ВМД, промежуточная стадия. **А.** Твердые и мягкие друзы мембраны Бруха (красные стрелки), отмеченные врачом. **Б.** Изображение, сегментированное алгоритмом

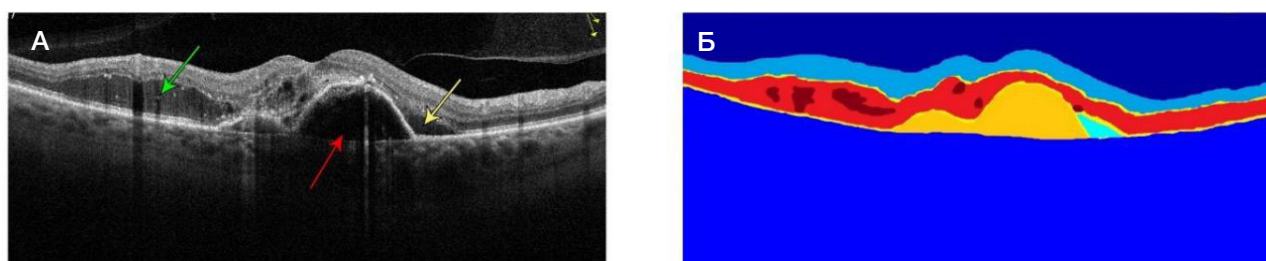
патологических участков сетчатки кодера UNet, визуализирующих ключевые области снимков, на основе которых осуществляли сегментацию данного предиктора.

Результаты сегментации при обучении нейронной сети на сформированном авторами наборе данных без включения блока концентрации внимания в структуру UNet составили 58,7% верно сегментированных областей патологий. Карты активации класса, представленные на рис. 1А, демонстрируют малую концентрацию внимания на признаках ВМД, что объясняет низкую точность выделения границ патологий.

При выборе алгоритма блока концентрации внимания было учтено, что слои сетчатки на ОКТ-снимке имеют четко выраженные перепады оттенков серого, что ярко выделяет деформацию пигментного эпителия и отека нейроэпителия. Выделение приведенных перепадов, учитывая их различия в размерах на разных стадиях заболевания, можно осуществить путем нахождения масштабно-инвариантных ключевых точек при помощи алгоритма Scale-Invariant Feature Transform (SIFT) [39], которые обозначают края и углы на изображении, и краев деформаций при помощи метода поиска адаптивного порогового значения (ПАПЗ), уже зарекомендовавшего себя в задачах выделения патологий [40].

Применение подхода SIFT с фиксированным нижним порогом масштаба ключевых точек, равным минимальным размерам друзы при ранней стадии ВМД [9], позволило повысить точность сегментации патологий до 76,7%, однако блок концентрации внимания выделяет ключевые области, не относящиеся к патологиям (рис. 1Б), что снижает концентрацию нейронной сети.

При использовании блока концентрации внимания, основанного на методе ПАПЗ, была достигнута точность 98,1% верно сегментированных областей патологий. Данный метод позволил сконцентрировать основное внимание нейронной сети на друзах (рис. 1В). При изменении частоты встречаемых патологий с равновесной на частоту по данным статистики [10, 11] точность выделения отека нейроэпителия снизилась на 15%, ввиду чего был сделан вывод, что распределение всех патологий на обучающей выборке для повышения эффективности должно быть равномерным.



**Рис. 3.** ОКТ-снимок макулярной области при ВМД, поздняя стадия. **А.** Признаки ВМД, отмеченные врачом (описание в тексте). **Б.** Данные, сегментированные алгоритмом

Результаты сегментации предикторов ВМД промежуточной стадии с применением последней версии блока концентрации внимания наглядно продемонстрированы на рис. 2. На ОКТ-снимке макулярной области (рис. 2А) визуализируются твердые и мягкие друзы мембраны Бруха, вызывающие деформацию пигментного эпителия (выделено стрелками). Слои, соответствующие структурным элементам фоторецепторов, приподняты над друзами. Внутренние слои нейроэпителия контурируются четко, без деформации. Фовеолярное углубление правильной конфигурации. На рис. 2Б данные области сегментированы алгоритмом, где деформация пигментного эпителия четко выделена желтым цветом, как и приподнятые над друзами слои оранжевого цвета.

Предикторы поздней стадии ВМД представлены на рис. 3А. Толщина сетчатки увеличена за счет кистозного отека нейроэпителия (зеленая стрелка), локальной элевации пигментного эпителия, предположительно вызванной наличием скрытой неоваскулярной мембраны (красная стрелка), под нейроэпителием определяется скопление гипорефлективного содержимого (желтая стрелка). Фовеа имеет вогнутый профиль. На рис. 3Б отек нейроэпителия выделен темно-красным, элевация пигментного эпителия — оранжевым, скопление жидкости под нейроэпителием — голубым цветом.

На основании полученных результатов была проведена автоматическая классификация стадий ВМД и рассчитаны показатели специфичности и чувствительности для каждой стадии (см. табл.). На основании полученных значений рассчитаны взвешенные чувствительности и специфичность классификатора стадий  $Se_w = 0,838$  и  $Sp_w = 0,849$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Представленные в работе результаты были получены для ОКТ-снимков от томографов нескольких производителей, что существенно повлияло на точность работы алгоритма сегментации ввиду различий в визуализации данных. Ввиду специфики работы методов блока концентрации внимания, в ходе которой различная маркировка ОКТ-снимков выделяется наряду с предикторами, необходима



Таблица. Показатели специфичности и чувствительности для каждой стадии

Метрики качества	Поздняя стадия	Ранняя стадия	Промежуточная стадия
Чувствительность <i>Se</i>	0,929	0,921	0,58
Специфичность <i>Sp</i>	0,823	0,769	0,993

реализация дополнительного обучения рекомендательной системы на новых примерах или удаление указанной информации, что может потребовать предварительной обработки изображений.

Также стоит отметить, что полученные формы сегментированных областей будут отличаться в зависимости от наличия и стадии заболевания. Эта информация содержит в себе предикторы, необходимые для работы рекомендательной системы выявления и определения стадии ВМД. Однако в ряде случаев границы соотношений формы областей патологий и верного с точки зрения эксперта диагноза могут быть весьма размыты в силу индивидуальных особенностей течения болезни у пациента и при различном выборе снимков радиального сканирования глаза. В связи с этим применение полносвязного слоя, что наиболее часто актуально в задачах компьютерного зрения с использованием нейронных сетей, в качестве классификатора стадий ВМД также потребует обширной обучающей выборки для выделения этих нечетких границ. Учитывая статистику о неравномерной частотности обнаружения стадий ВМД [10, 11], сложность решения данной задачи усугубляется еще больше. Аналогичные выводы будут справедливы и для пороговых значений определения стадий ВМД по площади патологий, ввиду чего их жесткое задание может повлечь за собой дополнительные ошибки. Следовательно, наиболее целесообразно будет применение методов нечеткой логики, эффективно отображающих эвристический опыт врача-эксперта, для анализа признаков, полученных от алгоритма сегментации.

Полученные обобщенные показатели специфичности и чувствительности алгоритма классификации свидетельствуют

о приемлемом качестве распознавания стадий ВМД (> 83%). Значения показателей во многом определены классификацией ОКТ-снимков от нескольких томографов с различными особенностями визуализации, что обусловлено стремлением повышения обобщающей способности алгоритма для приборов от разных производителей. Следует также отметить, что средний результат чувствительности получен для промежуточной стадии ВМД (всего 58%). Это можно объяснить тем, что данная стадия ВМД наиболее сложна для распознавания ввиду близости форм патологий. Для увеличения чувствительности при определении данной стадии ВМД в дальнейших исследованиях также планируется применение методов нечеткой логики для анализа патологий сетчатки.

## ВЫВОДЫ

Разработан алгоритм машинного обучения для сегментации патологий ВМД по ОКТ-изображениям с концентрацией внимания, результаты которого могут быть применены непосредственно для акцентирования внимания врача на наиболее важных для диагностики областей снимков или как часть рекомендательной системы выявления и определения стадии ВМД, разработка которой планируется в дальнейших исследованиях. Данный алгоритм показал свои перспективы в решении организационных проблем, связанных с диагностикой ВМД и уменьшением нагрузки на офтальмологов, а также эффективность распознавания ВМД на ОКТ-снимках, продемонстрировав 98,1% верно сегментированных областей патологий.

## Литература

1. Zapata MA, Royo-Fibla D, Font O, Vela JL, Marcantonio I, Moya-Sánchez EU, et al. Artificial intelligence to identify retinal fundus images, quality validation, laterality evaluation, macular degeneration, and suspected glaucoma. *Clinical Ophthalmology* (Auckland, NZ). 2020; 14: 419. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7025650/>.
2. Stark K, Olden M, Brandt C, Dietl A, Zimmermann ME, Scheller SC, et al. The German AugUR study: study protocol of a prospective study to investigate chronic diseases in the elderly. *BMC geriatrics*. 2015; 15 (1): 1–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12877-015-0122-0>.
3. Mehta S. Age-related macular degeneration. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2015; 42 (3): 377–91. Available from: [https://www.primarycare.theclinics.com/article/S0095-4543\(15\)00042-1/fulltext](https://www.primarycare.theclinics.com/article/S0095-4543(15)00042-1/fulltext).
4. Lawrenson JG, Evans JR, Downie LE. A critical appraisal of national and international clinical practice guidelines reporting nutritional recommendations for age-related macular degeneration: are recommendations evidence-based? *Nutrients*. 2019; 11 (4): 823. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/4/823>.
5. Li JQ, Welchowski T, Schmid M, Mauschitz MM, Holz FG, Finger RP. Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Ophthalmology*. 2020; 104 (8): 1077–84. Available from: <https://bjo.bmj.com/content/104/8/1077.abstract>.
6. Всемирный доклад о проблемах зрения [World report on vision]. Женева: Всемирная организация здравоохранения, 2020. Лицензия: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
7. Балашевич Л. И., Измайлов А. С., Улитина А. Ю. Модифицированная клиническая классификация возрастной макулярной дегенерации. *Офтальмологические ведомости*. 2011; 4 (4): 41–47. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/modifitsirovannaya-klinicheskaya-klassifikatsiya-vozrastnoy-makulyarnoy-degeneratsii>.
8. Авдеева О. Н., Аветисов С. Э., Аклаева Н. А., Акопов Е. Л., Алексеев В. Н., Астахов С. Ю., и др. редакторы. *Офтальмология: национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018; 625 с.
9. Ferris III FL, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, et al. Beckman Initiative for Macular Research Classification Committee. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2013; 120 (4): 844–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016164201201055X>.
10. Hyttinen JM, Kannan R, Felszeghy S, Niittikoski M, Salminen A, Kaarniranta K. The regulation of NFE2L2 (NRF2) signalling and epithelial-to-mesenchymal transition in age-related macular degeneration pathology. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20 (22): 5800. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/22/5800>.
11. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, De Jong Pt, et al. Prevalence of age-related macular degeneration

- in the United States. *Arch ophthalmol*. 2004; 122 (4): 564–72. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaophthalmology/article-abstract/416232>.
12. Schultz NM, Bhardwaj S, Barclay C, Gaspar L, Schwartz J. Global Burden of Dry Age-Related Macular Degeneration: A Targeted Literature Review. *Clin Ther*. 2021; 43 (10): 1792–818. DOI: 10.1016/J.CLINThER.2021.08.011.
  13. The Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebocontrolled, clinical trial of supplementation with vitamins C and E and beta-carotene for age related cataract and vision loss: AREDS report number 9. *Arch. Ophthalmol*. 2001; 119: 1439–52.
  14. Varma R, Bressler NM, Doan QV, Danese M, Dolan CM, Lee A, et al. Visual impairment and blindness avoided with ranibizumab in Hispanic and non-Hispanic whites with diabetic macular edema in the United States. *Ophthalmology*. 2015; 122 (5): 982–89. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161642014011476>.
  15. Азнабаев Б. М., Мухаммадеев Т. Р., Дибеев Т. И. Оптическая когерентная томография + ангиография глаза в диагностике, терапии и хирургии глазных болезней. М.: Август Борг, 2019; 57 с.
  16. Drexler W, Fujimoto JG, editors. *Optical coherence tomography: technology and applications*. Berlin: Springer, 2015; 2.
  17. Victor AA. The Role of Imaging in Age-Related Macular Degeneration. In *Visual Impairment and Blindness-What We Know and What We Have to Know*. London, UK: IntechOpen, 2019.
  18. Schmidt-Erfurth U, Sadeghipour A, Gerendas BS, Waldstein SM, Bogunović H. Artificial intelligence in retina. *Progress in retinal and eye research*. 2018; 67: 1–29. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946218300119>.
  19. Venhuizen FG, van Ginneken B, van Asten F, van Grinsven MJ, Fauser S, Hoyng CB, et al. Automated staging of age-related macular degeneration using optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2017; 58 (4): 2318–28. Available from: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2623584>.
  20. Шляпникова О. А., Каменских Т. Г., Рощепкин В. В., Решникова Л. Б. Перспективные направления развития офтальмологии (обзор). *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2021; 17 (3): 675–8. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/perspektivnye-napravleniya-razvitiya-ofthalmologii-obzor>.
  21. Quellec G, Lee K, Dolejsi M, Garvin MK, Abramoff MD, Sonka M. Three-dimensional analysis of retinal layer texture: identification of fluid-filled regions in SD-OCT of the macula. *IEEE transactions on medical imaging*. 2010; 29 (6): 1321–30. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/5440910>.
  22. Hu Z, Niemeijer M, Abramoff MD, Garvin MK. Multimodal retinal vessel segmentation from spectral-domain optical coherence tomography and fundus photography. *IEEE transactions on medical imaging*. 2012; 31 (10): 1900–11. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/6228540>.
  23. Esmaeili M, Dehnavi AM, Rabbani H, Hajizadeh F. Three-dimensional segmentation of retinal cysts from spectral-domain optical coherence tomography images by the use of three-dimensional curvelet based K-SVD. *Journal of medical signals and sensors*. 2016; 6 (3): 166. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4973460/>.
  24. Chakravarty A, Sivaswamy J. A supervised joint multi-layer segmentation framework for retinal optical coherence tomography images using conditional random field. *Comput. Methods Programs Biomed*. 2018; 165: 235–50. DOI: 10.1016/J.CMPB.2018.09.004.
  25. Bogunović H, et al. Machine Learning of the Progression of Intermediate Age-Related Macular Degeneration Based on OCT Imaging. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2017; 58 (6): BIO141–BIO150.
  26. Tvenning AO, Hanssen SR, Austeng D, Morken TS. Deep learning identify retinal nerve fibre and choroid layers as markers of age-related macular degeneration in the classification of macular spectral-domain optical coherence tomography volumes. *Acta Ophthalmologica*. 2022. DOI: 10.1111/AOS.15126.
  27. Rim TH, et al. Detection of features associated with neovascular age-related macular degeneration in ethnically distinct data sets by an optical coherence tomography: trained deep learning algorithm. *British Journal of Ophthalmology*. 2020; 105 (8): 1133–9. DOI: 10.1136/BJOPHTHALMOL-2020-316984.
  28. Zhang G, et al. Clinically relevant deep learning for detection and quantification of geographic atrophy from optical coherence tomography: a model development and external validation study. *Lancet Digit Heal*. 2021; 3 (10): e665–e675. DOI: 10.1016/S2589-7500(21)00134-5.
  29. Sousa JA, Paiva A, Silva A, Almeida JD, Braz Junior G, Diniz JO, et al. Automatic segmentation of retinal layers in OCT images with intermediate age-related macular degeneration using U-Net and DexiNed. *Plos one*. 2021; 16 (5): e0251591.
  30. Alsaihi Khaled, et al. Deep learning architectures analysis for age-related macular degeneration segmentation on optical coherence tomography scans. *Computer methods and programs in biomedicine*. 2020; 195: 105566.
  31. Lee B, D'Souza M, Singman EL, Wang J, Woreta FA, Boland MV, et al. Integration of a physician assistant into an ophthalmology consult service in an academic setting. *American journal of ophthalmology*. 2018; 190: 125–33. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002939418301387>.
  32. Pandey SK, Sharma V. Robotics and ophthalmology: Are we there yet? *Indian Journal of Ophthalmology*. 2019; 67 (7): 988. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6611303/>.
  33. Yan Y, Jin K, Gao Z, Huang X, Wang F, Wang Y, et al. Attention — based deep learning system for automated diagnoses of age-related macular degeneration in optical coherence tomography images. *Medical Physics*. 2021; 48 (9): 4926–34. DOI: 10.1002/MP.15002.
  34. Treder M, Lauermann JL, Eter N. Automated detection of exudative age-related macular degeneration in spectral domain optical coherence tomography using deep learning. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2017; 256 (2): 259–65. DOI: 10.1007/S00417-017-3850-3.
  35. Bhatia KK, Graham MS, Terry L, Wood A, Tranos P, Trikha S, et al. Disease classification of macular optical coherence tomography scans using deep learning software: validation on independent, multicenter data. *Retina*. 2020; 40 (8): 1549–57. DOI: 10.1097/IAE.0000000000002640.
  36. Tvenning AO, Hanssen SR, Austeng D, Morken TS. Deep learning identify retinal nerve fibre and choroid layers as markers of age-related macular degeneration in the classification of macular spectral-domain optical coherence tomography volumes. *Acta Ophthalmologica*. 2022. DOI: 10.1111/AOS.15126.
  37. Sunja AP, Kar S, Gayathri S, Gopi VP, Palanisamy P. Octnet: A lightweight cnn for retinal disease classification from optical coherence tomography images. *Computer methods and programs in biomedicine*. 2021; 200: 105877. DOI: 10.1016/J.CMPB.2020.105877.
  38. Juba B, Le HS. Precision-recalls versus accuracy and the role of large data sets. In *Proceedings of the AAAI conference on artificial intelligence*. 2019; 33 (01): 4039–48. DOI: 10.1609/AAAI.V33I01.33014039.
  39. Lowe DG. Distinctive image features from scale-invariant keypoints. *International journal of computer vision*. 2004; 60 (2): 91–110. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/B:VISI.0000029664.99615.94>
  40. Shahedi MB, Amirfattahi R, Azar FT, Sadri S. Accurate breast region detection in digital mammograms using a local adaptive thresholding method. In *Eighth International Workshop on Image Analysis for Multimedia Interactive Services (WIAMIS'07)*. IEEE. 2007; 26–26. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/4279134>.

## References

1. Zapata MA, Royo-Fibla D, Font O, Vela JI, Marcantonio I, Moya-Sánchez EU, et al. Artificial intelligence to identify retinal fundus images, quality validation, laterality evaluation, macular degeneration, and suspected glaucoma. *Clinical Ophthalmology* (Auckland, NZ). 2020; 14: 419. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7025650/>.
2. Stark K, Olden M, Brandl C, Dietl A, Zimmermann ME, Scheller SC, et al. The German AugUR study: study protocol of a prospective study to investigate chronic diseases in the elderly. *BMC geriatrics*. 2015; 15 (1): 1–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12877-015-0122-0>.
3. Mehta S. Age-related macular degeneration. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2015; 42 (3): 377–91. Available from: [https://www.primarycare.theclinics.com/article/S0095-4543\(15\)00042-1/fulltext](https://www.primarycare.theclinics.com/article/S0095-4543(15)00042-1/fulltext).
4. Lawrenson JG, Evans JR, Downie LE. A critical appraisal of national and international clinical practice guidelines reporting nutritional recommendations for age-related macular degeneration: are recommendations evidence-based? *Nutrients*. 2019; 11 (4): 823. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/4/823>.
5. Li JQ, Welchowski T, Schmid M, Mauschwitz M M, Holz FG, Finger RP. Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Ophthalmology*. 2020; 104 (8): 1077–84. Available from: <https://bjoo.bmj.com/content/104/8/1077.abstract>.
6. Vsemirnyj doklad o problemax zreniya [World report on vision]. Zheneva: Vsemirnaya organizaciya zdoravooxraneniya, 2020. Licenziya: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
7. Balashevich LI, Izmajlov AS, Ulitina AY. Modificirovannaya klinicheskaya klassifikaciya vozrastnoj makulyarnoy degeneracii. *Oftal'mologicheskie vedomosti*. 2011; 4 (4): 41–47. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/modifitsirovannaya-klinicheskaya-klassifikatsiya-vozrastnoy-makulyarnoy-degeneratsii>. Russian.
8. Avdeeva ON, Avetisov SEh, Aklaeva NA, Akopov EL, Alekseev VN, Astaxov SYu, i dr. redaktory. *Oftal'mologiya: nacional'noe rukovodstvo*. M.: GEHOTAR-Media, 2018; 625 s. Russian.
9. Ferris III FL, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, et al. Beckman Initiative for Macular Research Classification Committee. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2013; 120 (4): 844–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016164201201055X>.
10. Hyttinen JM, Kannan R, Felszeghy S, Niittykoski M, Salminen A, Kaarniranta K. The regulation of NFE2L2 (NRF2) signalling and epithelial-to-mesenchymal transition in age-related macular degeneration pathology. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20 (22): 5800. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/22/5800>.
11. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, De Jong Pt, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch ophthalmol*. 2004; 122 (4): 564–72. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaophthalmology/article-abstract/416232>.
12. Schultz NM, Bhardwaj S, Barclay C, Gaspar L, Schwartz J. Global Burden of Dry Age-Related Macular Degeneration: A Targeted Literature Review. *Clin Ther*. 2021; 43 (10): 1792–818. DOI: 10.1016/J.CLINTHERA.2021.08.011.
13. The Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of supplementation with vitamins C and E and beta-carotene for age related cataract and vision loss: AREDS report number 9. *Arch. Ophthalmol*. 2001; 119: 1439–52.
14. Varma R, Bressler NM, Doan QV, Danese M, Dolan CM, Lee A, et al. Visual impairment and blindness avoided with ranibizumab in Hispanic and non-Hispanic whites with diabetic macular edema in the United States. *Ophthalmology*. 2015; 122 (5): 982–89. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161642014011476>.
15. Aznabaev BM, Muxamadeev TR, Dibaev TI. Opticheskaya kogerentnaya tomografiya + angiografiya glaza v diagnostike, terapii i xirurgii glaznyx boleznej. M.: Avgust Borg, 2019; 57 s. Russian.
16. Drexler W, Fujimoto JG, editors. *Optical coherence tomography: technology and applications*. Berlin: Springer, 2015; 2.
17. Victor AA. The Role of Imaging in Age-Related Macular Degeneration. In *Visual Impairment and Blindness-What We Know and What We Have to Know*. London, UK: IntechOpen, 2019.
18. Schmidt-Erfurth U, Sadeghipour A, Gerendas BS, Waldstein SM, Bogunović H. Artificial intelligence in retina. *Progress in retinal and eye research*. 2018; 67: 1–29. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946218300119>.
19. Venhuizen FG, van Ginneken B, van Asten F, van Grinsven MJ, Fauser S, Hoyng CB, et al. Automated staging of age-related macular degeneration using optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2017; 58 (4): 2318–28. Available from: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2623584>.
20. Shlyapnikova OA, Kamenskikh TG, Roshhepkin VV, Reshnikova LB. Perspektivnye napravleniya razvitiya oftal'mologii (obzor). *Saratovskij nauchno-medicinskij zhurnal*. 2021; 17 (3): 675–8. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/perspektivnye-napravleniya-razvitiya-oftal'mologii-obzor>. Russian.
21. Quéllec G, Lee K, Dolejsi M, Garvin MK, Abramoff MD, Sonka M. Three-dimensional analysis of retinal layer texture: identification of fluid-filled regions in SD-OCT of the macula. *IEEE transactions on medical imaging*. 2010; 29 (6): 1321–30. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/5440910>.
22. Hu Z, Niemeijer M, Abramoff MD, Garvin MK. Multimodal retinal vessel segmentation from spectral-domain optical coherence tomography and fundus photography. *IEEE transactions on medical imaging*. 2012; 31 (10): 1900–11. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/6228540>.
23. Esmaeili M, Dehnavi AM, Rabbani H, Hajizadeh F. Three-dimensional segmentation of retinal cysts from spectral-domain optical coherence tomography images by the use of three-dimensional curvelet based K-SVD. *Journal of medical signals and sensors*. 2016; 6 (3): 166. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4973460/>.
24. Chakravarty A, Sivaswamy J. A supervised joint multi-layer segmentation framework for retinal optical coherence tomography images using conditional random field. *Comput. Methods Programs Biomed*. 2018; 165: 235–50. DOI: 10.1016/J.CMPB.2018.09.004.
25. Bogunović H, et al. Machine Learning of the Progression of Intermediate Age-Related Macular Degeneration Based on OCT Imaging. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2017; 58 (6): BIO141–BIO150.
26. Tvenning AO, Hanssen SR, Austeng D, Morken TS. Deep learning identify retinal nerve fibre and choroid layers as markers of age-related macular degeneration in the classification of macular spectral-domain optical coherence tomography volumes. *Acta Ophthalmologica*. 2022. DOI: 10.1111/AOS.15126.
27. Rim TH, et al. Detection of features associated with neovascular age-related macular degeneration in ethnically distinct data sets by an optical coherence tomography: trained deep learning algorithm. *British Journal of Ophthalmology*. 2020; 105 (8): 1133–9. DOI: 10.1136/BJOPHTHALMOL-2020-316984.
28. Zhang G, et al. Clinically relevant deep learning for detection and quantification of geographic atrophy from optical coherence tomography: a model development and external validation study. *Lancet Digit Heal*. 2021; 3 (10): e665–e675. DOI: 10.1016/S2589-7500(21)00134-5.
29. Sousa JA, Paiva A, Silva A, Almeida JD, Braz Junior G, Diniz JO, et al. Automatic segmentation of retinal layers in OCT images with intermediate age-related macular degeneration using U-Net and DexiNed. *Plos one*. 2021; 16 (5): e0251591.
30. Alsaih Khaled, et al. Deep learning architectures analysis for age-related macular degeneration segmentation on optical coherence tomography scans. *Computer methods and programs*

- in biomedicine. 2020; 195: 105566.
31. Lee B, D'Souza M, Singman EL, Wang J, Woreta FA, Boland MV, et al. Integration of a physician assistant into an ophthalmology consult service in an academic setting. *American journal of ophthalmology*. 2018; 190: 125–33. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002939418301387>.
  32. Pandey SK, Sharma V. Robotics and ophthalmology: Are we there yet? *Indian Journal of Ophthalmology*. 2019; 67 (7): 988. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6611303/>.
  33. Yan Y, Jin K, Gao Z, Huang X, Wang F, Wang Y, et al. Attention — based deep learning system for automated diagnoses of age-related macular degeneration in optical coherence tomography images. *Medical Physics*. 2021; 48 (9): 4926–34. DOI: 10.1002/MP.15002.
  34. Treder M, Laueremann JL, Eter N. Automated detection of exudative age-related macular degeneration in spectral domain optical coherence tomography using deep learning. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2017; 256 (2): 259–65. DOI: 10.1007/S00417-017-3850-3.
  35. Bhatia KK, Graham MS, Terry L, Wood A, Tranos P, Trikha S, et al. Disease classification of macular optical coherence tomography scans using deep learning software: validation on independent, multicenter data. *Retina*. 2020; 40 (8): 1549–57. DOI: 10.1097/IAE.0000000000002640.
  36. Tvenning AO, Hanssen SR, Austeng D, Morken TS. Deep learning identify retinal nerve fibre and choroid layers as markers of age-related macular degeneration in the classification of macular spectral-domain optical coherence tomography volumes. *Acta Ophthalmologica*. 2022. DOI: 10.1111/AOS.15126.
  37. Sunija AP, Kar S, Gayathri S, Gopi VP, Palanisamy P. Octnet: A lightweight cnn for retinal disease classification from optical coherence tomography images. *Computer methods and programs in biomedicine*. 2021; 200: 105877. DOI: 10.1016/J.CMPB.2020.105877.
  38. Juba B, Le HS. Precision-recall versus accuracy and the role of large data sets. In *Proceedings of the AAAI conference on artificial intelligence*. 2019; 33 (01): 4039–48. DOI: 10.1609/AAAI.V33I01.33014039.
  39. Lowe DG. Distinctive image features from scale-invariant keypoints. *International journal of computer vision*. 2004; 60 (2): 91–110. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/B:VISI.0000029664.99615.94>
  40. Shahedi MB, Amirfattahi R, Azar FT, Sadri S. Accurate breast region detection in digital mammograms using a local adaptive thresholding method. In *Eighth International Workshop on Image Analysis for Multimedia Interactive Services (WIAMIS'07)*. IEEE. 2007; 26–26. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/4279134>.



## ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НЕСЪЕМНЫХ РЕТЕЙНЕРОВ НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА РАЗМЕРОВ КРОНОК РЕЗЦОВ И КЛЫКОВ

М. А. Постников<sup>1</sup>, А. В. Бутвиловский<sup>2</sup> ✉, А. А. М. Алшарифи<sup>2</sup>, А. В. Мадатян<sup>3</sup>, И. С. Копецкий<sup>4</sup>, Д. А. Еремин<sup>4</sup><sup>1</sup> Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия<sup>2</sup> Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь<sup>3</sup> Сеченовский университет, Москва, Россия<sup>4</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

При планировании стоматологического лечения необходимо учитывать анатомические особенности зубов. Необходимость постоянного мониторинга изменчивости зубочелюстной системы определяет актуальность данной работы. Целью работы было оценить размеры коронок фронтальной группы зубов с помощью одонтометрии. Получены двухслойные одноэтапные оттиски и отлиты диагностические модели переднего участка челюстей у 50 мужчин и 50 женщин в возрасте 18–24 лет. Определены абсолютные значения размеров коронок резцов и клыков. Для оценки редукции латеральных резцов вычислен межрезцовый индекс (li) по зубам 22 и 21, половой диморфизм определен по формуле Garn–Lewis. Установлено, что различия мезиодистальных размеров коронок одноименных зубов правой и левой стороны отсутствуют ( $p > 0,05$ ). Мезиодистальные размеры коронок статистически значимо убывают в ряду: верхние центральные резцы → верхние клыки → нижние клыки и верхние латеральные резцы → нижние латеральные резцы → нижние центральные резцы. Степень выраженности редукции латеральных резцов низка ( $li = 74,9$ ) и более выражена у мужчин, чем у женщин. У обследованных пациентов среди передних зубов наибольшая высота коронки свойственна верхним центральным резцам и нижним клыкам, меньшая — верхним клыкам, а наименьшая — верхним латеральным резцам, нижним центральным и латеральным резцам. У мужчин высота коронок нижних клыков, верхних резцов и клыков статистически значимо ( $p < 0,001$ ) больше, чем у женщин. Полученные параметры коронок свидетельствуют об их достаточной высоте и мезиодистальных размерах, что в совокупности с низкой степенью выраженности редукции латеральных резцов обосновывает возможность изготовления несъемных ретейнеров прямым методом. Данные могут быть использованы и на этапе планирования стоматологического лечения.

**Ключевые слова:** анатомия зубов, одонтометрия, мезиодистальные размеры коронок зубов, высота коронок зубов, планирование стоматологического лечения, ретейнер

**Вклад авторов:** М. А. Постников — анализ литературы; А. В. Бутвиловский — планирование исследования; А. А. М. Алшарифи — сбор и интерпретация данных; А. В. Мадатян — подготовка черновика рукописи; И. С. Копецкий — сбор данных; Д. А. Еремин — анализ данных.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Белорусского государственного медицинского университета (протокол № 15 от 23 июня 2022 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Александр Валерьевич Бутвиловский  
пр. Дзержинского, д. 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь; alexbutv@rambler.ru

**Статья получена:** 11.11.2022 **Статья принята к печати:** 08.12.2022 **Опубликована онлайн:** 31.12.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.069

## JUSTIFICATION OF USE OF FIXED RETAINERS BASED ON THE ANALYSIS OF SIZE OF THE INCISOR AND CANINE CROWNS

Postnikov MA<sup>1</sup>, Butvilovsky AV<sup>2</sup> ✉, Alsharifi AAM<sup>2</sup>, Madatyan AV<sup>3</sup>, Kopetskiy IS<sup>4</sup>, Eremin DA<sup>4</sup><sup>1</sup> Samara State Medical University, Samara, Russia<sup>2</sup> Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus<sup>3</sup> Sechenov University, Moscow, Russia<sup>4</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Anatomical features of the teeth should be accounted for dental treatment plans. The need for constant monitoring of changes in the dentition system determines the relevance of this research. The study aimed to establish the size of anterior teeth with the help of odontology. We made bi-layer single stage impressions and cast diagnostic models of the anterior teeth of 50 male and 50 female participants aged 18–24 years. The absolute sizes of crowns of incisors and canines were established. To assess the reduction of lateral incisors, we calculated the interincisor index (li) of teeth 22 and 21; sexual dimorphism was determined using the Garn–Lewis formula. It was discovered that there are no differences in the mesiodistal widths of crowns of contralateral teeth on the right and left sides ( $p > 0.05$ ). The mesiodistal width of crowns of anterior teeth decreases (significant changes) in the following order: maxillary central incisors → maxillary canines → mandibular canines and maxillary lateral incisors → mandibular lateral incisors → mandibular central incisors. The degree of reduction of lateral incisors is low ( $li = 74.9$ ) and more prominent in males than in females. In the examined patients, the greatest mean length of crowns of anterior teeth is that of upper central incisors and lower canines, while upper canines are shorter in length and upper lateral incisors, lower central and lateral incisors have the shortest mean crown length. Males have longer (mean length) crowns of lower canines, upper incisors and canines than females, the difference being significant ( $p < 0.001$ ). The parameters of the crowns determined in this study showed that they have sufficient height and mesiodistal width, which, together with the low degree of reduction of the lateral incisors, justifies the possibility of direct fabrication of orthodontic fixed retainers. The data can also be used at the stage of dental treatment planning.

**Keywords:** teeth anatomy, odontology, teeth crowns mesiodistal dimensions, teeth crowns height, dental treatment planning, orthodontic retainer

**Author contribution:** Postnikov MA — literature analysis; Butvilovsky AV — research planning; Alsharifi AAM — data collection and interpretation; Madatyan AV — manuscript drafting; Kopetskiy IS — data collection; Eremin DA — data analysis.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethical Committee of the Belarusian State Medical University (Minutes #15 of June 23, 2022).

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander V. Butvilovsky  
pr. Dzerzhinskogo, 83, 220083, Minsk, Republic of Belarus; alexbutv@rambler.ru

**Received:** 11.11.2022 **Accepted:** 08.12.2022 **Published online:** 31.12.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.069

Ретенция — неотъемлемый этап ортодонтического лечения, определяемый как сохранение оптимального эстетического и функционального положения зубов после прекращения активного ортодонтического лечения [1].

Клинические случаи после завершения активного ортодонтического лечения следует рассматривать как динамичные и постоянно меняющиеся. Возникает необходимость в постоянной ретенции, чтобы обеспечить стабильность положения зубов после лечения. При выборе ретейнера следует учитывать ряд биологических целей: поддержание периодонта, поддержание оптимальной гигиены полости рта, сохранение оптимальных функциональных нагрузок на зубы [2, 3].

Потенциальный рецидив может быть связан с длительным ремоделированием тканей периодонта, мышечным дисбалансом или изменениями, вызванными ростом и старением [4]. В долгосрочных исследованиях обнаружено, что в 90% случаев рецидивы возникают в течение 10–20 лет после окончания ретенции [5]. Так как в ретенции нуждается не весь зубной ряд, был введен термин «дифференциальная ретенция», подразумевающий особое внимание к участку, наиболее склонному к рецидиву в каждом ортодонтическом случае [3].

Ретенционные аппараты (ретейнеры) можно разделить на несъемные и съемные. Как следует из названия, пациенты могут снимать съемные ретейнеры, что позволяет им легче поддерживать адекватный уровень гигиены полости рта и носить их неполный день, если имеется такая необходимость. Однако бывают ситуации, когда ретейнеры требуется носить 24 ч в сутки каждый день, чтобы снизить вероятность рецидива, и в таких ситуациях обычно требуется несъемный ретейнер [6, 7].

Съемные аппараты были аппаратами выбора для ретенционных целей в течение многих лет. В 1970-х годах были предложены несъемные ретейнеры для предотвращения рецидива в области нижних резцов [8]. В исследовании, опубликованном в 2002 г., сообщалось, что треть ортодонтот предпочитает фиксированные лингвальные ретейнеры на нижней челюсти, тогда как 5% предпочитают фиксированные ретейнеры на верхней челюсти [9]. В публикации в 2011 г. сообщалось, что несъемные ретейнеры предпочитают уже 42% ортодонтот на нижней челюсти и 11% ортодонтот — на верхней челюсти [10].

Существует сильная вариация по регионам в предпочитаемых врачами-ортодонтами способах ретенции достигнутых результатов. Например, в Норвегии и Нидерландах для верхней челюсти часто назначают как фиксированные, так и съемные ретейнеры, а для нижней — фиксированные. В Швейцарии комбинацию двух видов ретейнеров часто используют при удалении зубов на верхней челюсти и ее расширении. В США, Саудовской Аравии и Австралии на верхнюю челюсть обычно назначают съемные ретейнеры, а на нижнюю — несъемные. В большинстве исследований предпочтительным типом съемного ретейнера являются вакуумно-формованные ретейнеры [11, 12].

Что касается продолжительности ношения, постоянную ретенцию назначают менее 20% ортодонтот в Норвегии, 52% — в Саудовской Аравии, примерно 80% — в Австралии, США и Великобритании и 90% — в Германии. Эти различия в подходах врачей-ортодонтот подчеркивают важность четкого понимания относительных достоинств каждого вида ретенции [11].

В последние годы список показаний для несъемных ретейнеров существенно расширился [13]:

- случаи с закрытием диастемы;
- случаи с тремами между фронтальными зубами;
- взрослые пациенты с потенциальной постортодонтической миграцией зубов;
- случаи с потерей зубов или большими тремами на верхней челюсти до ортодонтического лечения;
- случаи с лечением путем удаления резцов нижней челюсти;
- выраженная тортоаномалия резцов верхней челюсти до ортодонтического лечения;
- случаи со скорректированной небной импакцией клыков.

Преимущества несъемных ретейнеров: легкая адаптация (обычно адаптационный период длится не более недели); они не требуют активного участия пациента в ретенции; воздействуют на зубы постоянно, что позволяет сократить ретенционный период и уменьшить риск рецидива; практически не видны при разговоре; минимально влияют на дикцию [14].

Несъемные ретейнеры могут быть изготовлены прямым и косвенным методами. Выбор метода шинирования зависит от анатомических особенностей фронтальной группы зубов [15, 16].

Проведение одонтометрических и одонтоскопических исследований позволяет научно обосновать метод выбора шинирования зубов. Данные мероприятия необходимо проводить в динамике из-за изменчивости особенностей зубочелюстной системы населения [17–19]. Путем одонтометрических исследований можно получить результаты по следующим критериям.

1. Анатомия коронок. Выбор зуба, подлежащего удалению по ортодонтическим показаниям, определяет анатомия его коронки. Этот выбор является предметом постоянных дебатов среди ортодонтических школ. Когда есть необходимость в удалении зубов для создания пространства, некоторые школы рекомендуют систематическое удаление определенного зуба, а не любого, и происходит это из-за анатомического строения коронок зубов. Так, на верхней челюсти чаще удаляют второй премоляр, а не первый. Идея, лежащая в основе этой концепции, заключается в том, что удаление первого премоляра может вызвать дисбаланс, а также эстетическое и функциональное несоответствие зубных дуг. Проведение одонтометрии необходимо также при планировании стоматологического лечения (эстетические реставрации, ортопедическое лечение) и целесообразно при диагностике повышенной стираемости зубов и их последующей реконструкции [20, 21].

2. Анатомия корней. Ортодонтическая литература обосновывает важность корневой анатомии в ортодонтическом лечении посредством концепции анкера. Анкер — сопротивление нежелательному смещению зубов [22].

В этом случае для каждого зуба назначают определенное значение анкера на основе различных критериев: поверхности корня; периодонтальной связки, способной противостоять движению независимо от ее направления; длины корня, т. е. более длинный корень считается глубже закрепленным. Наиболее предпочтителен метод расчета анкера — оценка объема корня, представляющего трехмерную целостность корня и альвеолярной кости [20].

3. Анатомия всего зуба. В некоторых клинических ситуациях анатомия всего зуба диктует план лечения, например, в случае транспозиции бокового резца и клыка верхней челюсти. В настоящее время с развитием восстановительной и ортопедической стоматологии стало возможным изменение формы коронки зуба

Таблица 1. Мезиодистальные размеры коронок резцов и клыков

Зуб	Мезиодистальные размеры, мм	Значение $U$	Значение $p$
13	7,30 (6,86–7,77)	835	0,903
23	7,27 (6,93–7,63)		
12	6,10 (5,72–6,65)	4753	0,547
22	6,07 (5,71–6,52)		
11	8,08 (7,77–8,43)	4931	0,964
21	8,07 (7,75–8,48)		
31	5,12 (4,84–5,42)	4802	0,807
41	5,12 (4,85–5,38)		
32	5,51 (5,27–5,81)	4694	0,455
42	5,51 (5,20–5,73)		
33	6,31 (6,07–6,72)	4935	0,874
43	6,39 (6,03–6,70)		

(коронопластика), что часто проводят на латеральном резце с приданием ему формы клыка [20].

Следует отметить, что ранее в Республике Беларусь одонтометрические исследования проводились более 10 лет назад, что в совокупности с необходимостью постоянного мониторинга изменчивости зубочелюстной системы [23] определяет актуальность данной работы.

Целью исследования было оценить размеры коронок резцов и клыков и обосновать возможность использования несъемных ретейнеров у жителей Республики Беларусь.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Двухслойные одноэтапные оттиски (с помощью одноразовых пластмассовых ложек и С-силикона «Zetaplus L TrialKit» (Zhermack S. p.a; Италия) переднего участка челюстей у 100 человек (50 мужчин, 50 женщин). Критерии включения: возраст 18–24 лет; постоянное проживание в Республике Беларусь. Критерии исключения: отказ от участия в исследовании, наличие реставраций и ортопедических конструкций на верхних и нижних резцах и клыках.

Были отлиты диагностические модели из супергипса «EliteModel» («Zhermack S. p.a»), на которых определили мезиодистальные размеры (между выступающими точками мезиальных и дистальных краев коронки) и высоту коронок резцов и клыков с помощью электронного штангенциркуля DR6003 (Dr. Iron; Китай) с разрешающей способностью 0,01 мм и погрешностью измерений  $\pm 0,01$  мм. Полученные результаты по измерению 797 резцов (в том числе 199 верхних центральных, 200 верхних латеральных, 200 нижних центральных, 198 нижних латеральных) и 400 клыков (в том числе 200 верхних, 200 нижних) фиксировали в разработанной нами карте обследования.

Для оценки степени редукции латеральных резцов был вычислен межрезцовый индекс (li) по зубам 22 и 21 [24, 25], половой диморфизм определили по формуле Garn–Lewis с использованием медианных значений [26].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Past 3.0 [27]. Описание количественных переменных представляли в виде медианы, нижнего и верхнего квантилей  $Me (Q_1–Q_3)$ . Степень интенсивности вариации определяли с помощью коэффициента вариации ( $V$ ).

Значимость различий при сравнении двух независимых групп определяли по критериям  $U$  (Манна–Уитни) и  $\chi^2$  (Пирсона) с критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез, равном 0,05. Значимость различий при множественном сравнении определяли по критерию  $H$  (Краскела–Уоллиса, с критическим уровнем значимости, равным 0,05), при апостериорных сравнениях — по критерию  $z$  (Данна) с поправкой Бонферрони (с критическим уровнем значимости 0,0034 (шесть сравниваемых групп)) [28, 29].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Медиана возраста обследованных пациентов составила 21,0 (20,0–22,0) год; статистически значимые различия возраста мужчин (21,0 (20,0–22,3)) и женщин (21,0 (21,0–21,3)) не обнаружены ( $U = 1116$ ;  $p > 0,05$ ). Мезиодистальные размеры коронок фронтальной группы зубов представлены в табл. 1.

Установлено, что различия мезиодистальных размеров коронок одноименных зубов правой и левой стороны отсутствуют и можно объединить их в группы. При множественном сравнении сформированных групп зубов обнаружены значимые различия между ними ( $H = 937,0$ ;

Таблица 2. Значение критерия  $z$  (в левом нижнем углу) и ошибки  $p$  для попарных сравнений сформированных групп зубов по мезиодистальным размерам коронки

Зубы	Значения $z$ и $p$					
	13 + 23	12 + 22	11 + 21	31 + 41	32 + 42	33 + 43
13 + 23	–	< 0,001	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001
12 + 22	10,31	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,012
11 + 21	4,64	14,94	–	< 0,001	< 0,001	< 0,001
31 + 41	20,71	10,42	25,31	–	< 0,001	< 0,001
32 + 42	16,96	6,65	21,58	3,79	–	< 0,001
33 + 43	7,79	2,53	12,42	12,94	9,18	–

Примечание: здесь и далее серым цветом выделены ячейки, где  $p < p_{\text{крит.}}$

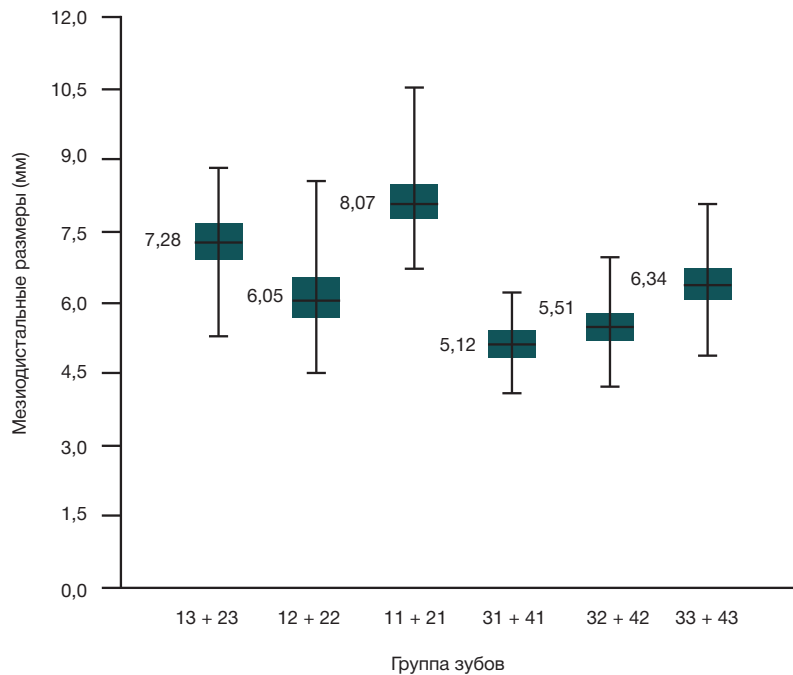


Рис. 1. Сравнение мезиодистальных размеров коронок отдельных групп зубов

$p < 0,001$ ), при апостериорных сравнениях (табл. 2) значимые различия отмечены между всеми группами (за исключением сравнения нижних клыков и верхних латеральных резцов).

Мезиодистальные размеры коронок (рис. 1) убывают в ряду: верхние центральные резцы (8,07 (7,77–8,46 мм)) — верхние клыки (7,28 (6,93–7,69) мм) — нижние клыки (6,34 (6,05–6,70) мм) и верхние латеральные резцы (6,05 (5,71–6,58) мм) — нижние латеральные резцы (5,51 (5,23–5,77) мм) — нижние центральные резцы (5,12 (4,85–5,39) мм). Следует отметить, что полученные данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований [23].

При сравнении MD-размеров коронок фронтальных зубов в зависимости от пола (табл. 3) обнаружены статистически значимые различия этого параметра у мужчин и у женщин для верхних латеральных резцов (5,92 (5,38–6,35) мм и 6,32 (5,94–6,66) мм соответственно) и нижних латеральных резцов (5,45 (5,10–5,69) мм и 5,53 (5,33–5,86) мм соответственно). Следует отметить, что наибольшая степень полового диморфизма оказалась свойственна верхним латеральным резцам (значение индекса Gang–Lewis составило –6,3).

Значение  $I_i$  для всех обследованных пациентов составило 74,9 (70,8–80,8), что свидетельствует о низкой степени выраженности редукции латеральных резцов. Установлено, что степень интенсивности вариации  $I_i$  является низкой ( $V = 9,62$ ), а его значение менее 70 было отмечено только в 21% случаев.

У женщин значение межрезцового индекса оказалось равным 76,3 (73,1–82,0), что на 4,0% статистически значимо ( $U = 855$ ;  $p < 0,01$ ) больше такового у мужчин (73,4 (67,8–78,1)). Значение анализируемого параметра менее 70 встречалось в 4,3 раза чаще ( $\chi^2 = 10,2$ ;  $p < 0,01$ ) у мужчин ( $n = 17$ ; 34,0%), чем у женщин ( $n = 4$ ; 8,0%), что позволяет сделать вывод о более выраженной редукции латеральных резцов у представителей мужского пола среди населения Республики Беларусь.

Полученные данные по высоте коронок фронтальной группы зубов представлены в табл. 4.

Обнаружено, что значения высоты коронок одноименных зубов правой и левой стороны не различаются ( $p > 0,05$ ), и это позволяет объединить их в группы (рис. 2). При множественном сравнении сформированных групп зубов значение критерия Краскела–Уоллиса составило

Таблица 3. Мезиодистальные размеры коронок фронтальной группы зубов у мужчин и женщин

Зубы	Пол	Мезиодистальные размеры, мм	Значение $U$	Значение $p$	Половой диморфизм
Верхние клыки	мужской	7,26 (6,92–7,63)	4371	0,125	–1,6
	женский	7,38 (6,95–7,80)			
Верхние латеральные резцы	мужской	5,92 (5,38–6,35)	3161	<0,001	–6,3
	женский	6,32 (5,94–6,66)			
Верхние центральные резцы	мужской	7,99 (7,59–8,40)	4256	0,088	–1,8
	женский	8,14 (7,81–8,51)			
Нижние центральные резцы	мужской	5,09 (4,81–5,37)	4455	0,27	–1,5
	женский	5,17 (4,89–5,42)			
Нижние латеральные резцы	мужской	5,45 (5,10–5,69)	3907	0,008	–1,4
	женский	5,53 (5,33–5,86)			
Нижние клыки	мужской	6,37 (6,03–6,72)	4852	0,718	1
	женский	6,31 (6,06–6,68)			



Таблица 4. Высота коронок резцов и клыков

Зуб	Высота коронки, мм	Значение <i>U</i>	Значение <i>p</i>
13	9,29 (8,59–9,99)	4701	0,247
23	9,18 (8,54–9,84)		
12	8,14 (7,47–8,77)	4695	0,456
22	8,25 (7,65–8,69)		
11	9,60 (8,91–10,27)	4917	0,936
21	9,58 (9,01–10,26)		
31	7,91 (7,30–8,70)	4645	0,526
41	7,88 (7,22–8,60)		
32	8,28 (7,62–8,94)	4867	0,746
42	8,19 (7,61–8,91)		
33	9,53 (8,81–10,24)	4953	0,906
43	9,51 (8,78–10,24)		

371,2, что свидетельствует о статистически значимых различиях между ними ( $p < 0,001$ ).

Наибольшая высота коронки оказалась свойственна верхним центральным резцам (9,60 (8,96–10,27) мм), нижним клыкам (9,51 (8,81–10,24) мм) и верхним клыкам (9,23 (8,55–9,90) мм), а наименьшая — верхним латеральным резцам (8,20 (7,54–8,72) мм), нижним центральным и латеральным резцам (7,89 (7,23–8,63) и 8,22 (7,62–8,91) мм соответственно).

Результаты проведенных апостериорных сравнений представлены в табл. 5. Обнаружено, что значимые различия присутствуют между всеми группами (за исключением сравнения верхних клыков с нижними клыками, верхних латеральных резцов с нижними резцами, верхних центральных резцов с нижними клыками).

Установлено, что у мужчин высота коронок нижних клыков, верхних центральных и латеральных резцов и клыков (табл. 6) статистически значимо больше таковой у женщин (значения индекса Gang-Lewis по данному признаку составили соответственно 8,4, 6,8, 7,3 и 4,7).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенного исследования обнаружено, что мезиодистальные размеры коронок фронтальных зубов у населения Республики Беларусь последовательно убывают в представленном ряду: верхние центральные резцы (8,07 (7,77–8,46 мм)) — верхние клыки (7,28 (6,93–7,69) мм) — нижние клыки (6,34 (6,05–6,70) мм) и верхние латеральные резцы (6,05 (5,71–6,58) мм) — нижние латеральные резцы (5,51 (5,23–5,77) мм) — нижние центральные резцы (5,12 (4,85–5,39) мм). Полученные данные согласуются с результатами исследования, завершено в 2009 г. [23]. Коронки верхних и нижних латеральных резцов у женщин имеют большие мезиодистальные размеры, чем у мужчин.

Установлено, что степень выраженности редукции латеральных резцов является низкой ( $li = 74,9$  (70,8–80,8)). Редукция латеральных резцов у представителей мужского пола среди населения Республики Беларусь ( $li = 73,4$  (67,8–78,1)) более выражена, чем у женщин ( $li = 76,3$  (73,1–82,0)). Данный вывод согласуется с результатами исследования,

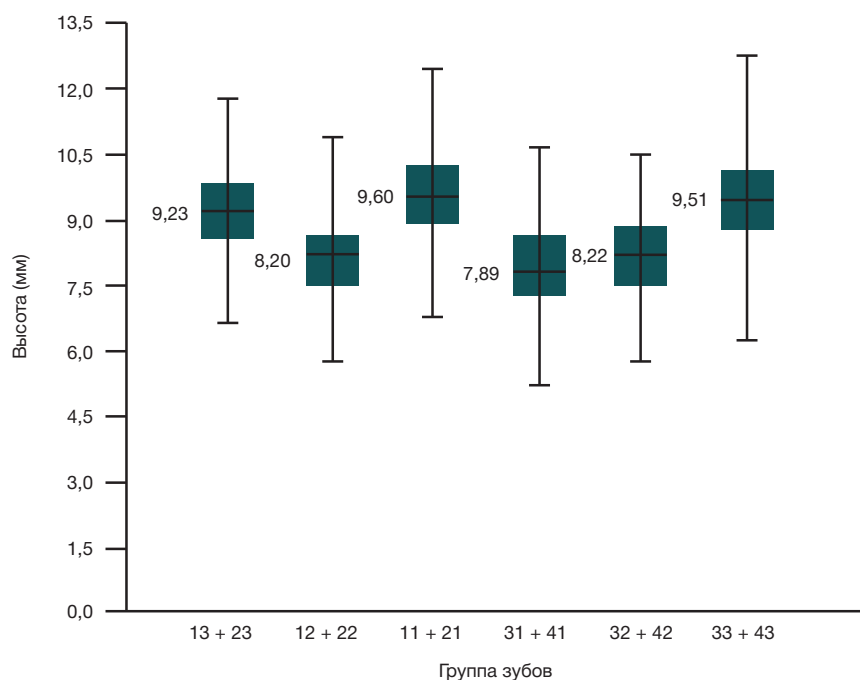


Рис. 2. Сравнение высоты коронок отдельных групп зубов

Таблица 5. Значение критерия  $z$  (в левом нижнем углу) и ошибки  $p$  для попарных сравнений сформированных групп зубов по высоте коронки

Зубы	Значения $z$ и $p$					
	13 + 23	12 + 22	11 + 21	31 + 41	32 + 42	33 + 43
13 + 23	–	< 0,001	0,002	< 0,001	< 0,001	0,037
12 + 22	8,89	–	< 0,001	0,109	0,438	< 0,001
11 + 21	3,13	12	–	< 0,001	< 0,001	0,295
31 + 41	10,47	1,61	13,57	–	0,017	< 0,001
32 + 42	8,11	0,78	11,23	2,38	–	< 0,001
33 + 43	2,08	10,97	1,05	12,54	10,19	–

Таблица 6. Высота коронок фронтальной группы зубов у мужчин и женщин

Зубы	Пол	Высота, мм	Значение $U$	Значение $p$	Половой диморфизм
Верхние клыки	мужской	9,52 (9,09–10,23)	3094	< 0,001	4,7
	женский	8,90 (7,87–9,52)			
Верхние латеральные резцы	мужской	8,42 (8,02–9,02)	3061	< 0,001	7,3
	женский	7,85 (7,10–8,45)			
Верхние центральные резцы	мужской	9,99 (9,21–10,40)	3029	< 0,001	6,8
	женский	9,35 (8,43–9,90)			
Нижние центральные резцы	мужской	7,94 (7,43–8,66)	4414	0,228	0,8
	женский	7,88 (7,13–8,60)			
Нижние латеральные резцы	мужской	8,33 (7,66–9,07)	4315	0,094	2,8
	женский	8,10 (7,56–8,79)			
Нижние клыки	мужской	9,93 (9,18–10,74)	2845	< 0,001	8,4
	женский	9,16 (8,44–9,88)			

в ходе которого было установлено преобладание редукции латерального резца у мужчин [30].

У обследованных пациентов среди передних зубов наибольшая высота коронки свойственна верхним центральным резцам (9,60 (8,96–10,27) мм) и нижним клыкам (9,51 (8,81–10,24) мм), меньшая — верхним клыкам (9,23 (8,55–9,90) мм), а наименьшая — верхним латеральным резцам (8,20 (7,54–8,72) мм), нижним центральным и латеральным резцам (7,89 (7,23–8,63) и 8,22 (7,62–8,91) мм соответственно). Доказано, что у мужчин высота коронок нижних клыков, верхних резцов и клыков статистически значимо больше таковой, чем у женщин.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, полученные результаты по размерам коронок резцов и клыков свидетельствуют об их достаточной высоте и мезиодистальных размерах, что в совокупности с низкой степенью выраженности редукции латеральных резцов обосновывает возможность изготовления несъемных ретейнеров прямым методом. Полученные данные могут также быть использованы на этапе планирования стоматологического лечения (эстетические реставрации, ортопедическое и ортодонтическое лечение).

## Литература

1. Beam DR. Bonded orthodontic retainers: a review. Am J Orthod Dentofac Orthop. 1995; 108 (2): 207–13. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0889-5406\(95\)70085-4](https://doi.org/10.1016/S0889-5406(95)70085-4).
2. Zachrisson BU. Long-term experience with direct-bonded retainers: update and clinical advice. J Clin Orthod. 2007; 12 (2): 728–37.
3. Eapen JC, Prakash A. Enigma of Fixed Retainers. Orthodontic Journal of Nepal. 2017; 7 (2): 52–55. Available from: <https://doi.org/10.3126/ojn.v7i2.20168>.
4. Bondemark L, et al. Long-term stability of orthodontic treatment and patient satisfaction. A systematic review. Angle Orthod. 2007; 77 (1): 181–91. Available from: <https://doi.org/10.2319/011006-16R.1>.
5. Little RM, Riedel RA, Artun J. An evaluation of changes in mandibular anterior alignment from 10 to 20 years postretention. Am J Orthod Dentofac Orthop. 1988; 93 (5): 423–8. Available from: [https://doi.org/10.1016/0889-5406\(88\)90102-3](https://doi.org/10.1016/0889-5406(88)90102-3).
6. Карпов А. Н., Постников М. А., Степанов Г. В. Ортодонтия: учебник. Самара: Право, 2022; 319 с.
7. Johnston CD, Littlewood SJ. Retention in orthodontics. Br Dent J. 2015; 218 (3): 119–22. Available from: <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2015.47>.
8. Pandis N, et al. Long-term periodontal status of patients with mandibular lingual fixed retention. Eur J Orthod. 2007; 29 (5): 471–6. Available from: <https://doi.org/10.1093/ejo/cjm042>.
9. Keim RG, et al. JCO study of orthodontic diagnosis and treatment procedures. Part 1. Results and trends. J Clin Orthod. 2002; 36 (10): 553–68.
10. Pratt MC, et al. Evaluation of retention protocols among members of the American Association of Orthodontists in the United States. Am J Orthod Dentofac Orthop. 2011; 140 (4): 520–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2010.10.023>.
11. Al-Moghrbi S, Littlewood J, Fleming PS. Orthodontic retention protocols: an evidence-based overview. Br Dent J. 2021; 230 (11): 770–6. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41415-021-2954-7>.

12. Padmos JAD, Fudalej PS, Renkema AM. Epidemiologic study of orthodontic retention procedures. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2018; 153 (4): 496–504. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2017.08.013>.
13. Zachrisson BU. The bonded lingual retainer and multiple spacing of anterior teeth. *Swed Dent J Suppl.* 1982; 15: 247–55.
14. Хотайт А. Х., Бутвиловский А. В. Способ изготовления несъемного индивидуального ретейнера. *Ортодонтия. Гнатология.* 2020; 3 (2): 22–26.
15. Картон Е. А. Ленденгольц Ж. А., Персин Л. С. Ретенция и рецидивы: учеб. М.: МГМСУ, 2006; 46 с.
16. Бутвиловский А. В., Хотайт А. Х. Опыт применения High-Q-Bond light cure retainer (BJM LAB) для временного шинирования зубов. *Стоматологический журнал.* 2017; 1: 69–71.
17. Гатальский В. В. Межпоколенная и эпохальная изменчивость особенностей зубочелюстной системы в популяциях Белоруссии. (диссертация). Минск, 2000; 19 с.
18. Постников М. А., редактор. Ортодонтия. Этиология, патогенез, диагностика и профилактика зубочелюстных аномалий и деформаций: учебник — часть 1. Самара: Право, 2022; 348 с.
19. Постников М. А. и др. Клинико-рентгенологические методы диагностики в стоматологии: учебное пособие. Самара: Право, 2021; 141 с.
20. Nabbout F, Baron P. Orthodontics and Dental Anatomy: Three-dimensional Scanner Contribution. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2017; 7 (6): 321–8. Available from: [https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD\\_394\\_17](https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_394_17).
21. Feldmann I, Bondemark L. Orthodontic anchorage: a systematic review. *Angle Orthod.* 2006; 76 (3): 493–501.
22. Постников М. А., и др. Особенности диагностики и лечения пациентов с повышенной стираемостью зубов (обзор литературы). 2021; 93 (4): 40–42.
23. Тегак О. В. Морфологическая изменчивость коронки и корневой системы зубов у населения г. Минска (диссертация). Минск, 2009; 18 с.
24. Zubov A. A. *Одонтология. Методика антропологических исследований.* М.: Наука, 1968; 199 с.
25. Луцкая И. К. *Терапевтическая стоматология: учеб. пособие.* Минск: Высшая школа, 2014; с. 258–9.
26. Garn SM, Lewis AB, Kerewsky RS. The relationship between sexual dimorphism in tooth size and body size as studied within families. *Arch Oral Biol.* 1967; 12 (2): 299–301. Available from: [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(67\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0003-9969(67)90050-7).
27. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica.* 2001; 4 (1): 1–9.
28. Гржибовский А. М. Анализ трех и более независимых групп данных. *Экология.* 2008; 3: 50–58.
29. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиасфера, 2002; 312 с.
30. Зюлькина Л. А. Половой диморфизм одонтометрических характеристик у жителей Пензенского региона 21–36 лет в зависимости от параметров кранио-фациального комплекса (диссертация). Волгоград, 2011; 23 с.

## References

1. Bearn DR. Bonded orthodontic retainers: a review. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 1995; 108 (2): 207–13. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0889-5406\(95\)70085-4](https://doi.org/10.1016/S0889-5406(95)70085-4).
2. Zachrisson BU. Long-term experience with direct-bonded retainers: update and clinical advice. *J Clin Orthod.* 2007; 12 (2): 728–37.
3. Eapen JC, Prakash A. Enigma of Fixed Retainers. *Orthodontic Journal of Nepal.* 2017; 7 (2): 52–55. Available from: <https://doi.org/10.3126/ojn.v7i2.20168>.
4. Bondemark L, et al. Long-term stability of orthodontic treatment and patient satisfaction. A systematic review. *Angle Orthod.* 2007; 77 (1): 181–91. Available from: <https://doi.org/10.2319/011006-16R.1>.
5. Little RM, Riedel RA, Artun J. An evaluation of changes in mandibular anterior alignment from 10 to 20 years postretention. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 1988; 93 (5): 423–8. Available from: [https://doi.org/10.1016/0889-5406\(88\)90102-3](https://doi.org/10.1016/0889-5406(88)90102-3).
6. Karpov AN, Postnikov MA, Stepanov GV. *Ortodontiya: uchebnik.* Samara: Pravo, 2022; 319 s. Russian.
7. Johnston CD, Littlewood SJ. Retention in orthodontics. *Br Dent J.* 2015; 218 (3): 119–22. Available from: <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2015.47>.
8. Pandis N, et al. Long-term periodontal status of patients with mandibular lingual fixed retention. *Eur J Orthod.* 2007; 29 (5): 471–6. Available from: <https://doi.org/10.1093/ejo/cjm042>.
9. Keim RG, et al. JCO study of orthodontic diagnosis and treatment procedures. Part 1. Results and trends. *J Clin Orthod.* 2002; 36 (10): 553–68.
10. Pratt MC, et al. Evaluation of retention protocols among members of the American Association of Orthodontists in the United States. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2011; 140 (4): 520–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2010.10.023>.
11. Al-Moghrbi S, Littlewood J, Fleming PS. Orthodontic retention protocols: an evidence-based overview. *Br Dent J.* 2021; 230 (11): 770–6. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41415-021-2954-7>.
12. Padmos JAD, Fudalej PS, Renkema AM. Epidemiologic study of orthodontic retention procedures. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2018; 153 (4): 496–504. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2017.08.013>.
13. Zachrisson BU. The bonded lingual retainer and multiple spacing of anterior teeth. *Swed Dent J Suppl.* 1982; 15: 247–55.
14. Хотайт АХ, Бутвиловский АВ. Способ изготовления несъемного индивидуального ретейнера. *Ортодонтия. Гнатология.* 2020; 3 (2): 22–26. Russian.
15. Картон ЕА, Ленденгольц ЖА, Персин ЛС. Ретенция и рецидивы: учеб. М.: МГМСУ, 2006; 46 с. Russian.
16. Бутвиловский АВ, Хотайт АХ. Опыт применения High-Q-Bond light cure retainer (BJM LAB) для временного шинирования зубов. *Стоматологический журнал.* 2017; 1: 69–71. Russian.
17. Гатальский ВВ. Межпоколенная и эпохальная изменчивость особенностей зубочелюстной системы в популяциях Белоруссии (диссертация). Минск, 2000; 19 с. Russian.
18. Постников МА, редактор. Ортодонтия. Этиология, патогенез, диагностика и профилактика зубочелюстных аномалий и деформаций: учебник — часть 1. Самара: Право, 2022; 348 с. Russian.
19. Постников МА, и др. Клинико-рентгенологические методы диагностики в стоматологии: учебное пособие. Самара: Право, 2021; 141 с. Russian.
20. Nabbout F, Baron P. Orthodontics and Dental Anatomy: Three-dimensional Scanner Contribution. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2017; 7 (6): 321–8. Available from: [https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD\\_394\\_17](https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_394_17).
21. Feldmann I, Bondemark L. Orthodontic anchorage: a systematic review. *Angle Orthod.* 2006; 76 (3): 493–501.
22. Постников МА, и др. Особенности диагностики и лечения пациентов с повышенной стираемостью зубов (обзор литературы). 2021; 93 (4): 40–42. Russian.
23. Тегак ОВ. Морфологическая изменчивость коронки и корневой системы зубов у населения г. Минска (диссертация). Минск, 2009; 18 с. Russian.
24. Zubov AA. *Одонтология. Методика антропологических исследований.* М.: Наука, 1968; 199 с. Russian.
25. Луцкая ИК. *Терапевтическая стоматология: учеб. пособие.* Минск: Высшая школа, 2014; с. 258–9. Russian.
26. Garn SM, Lewis AB, Kerewsky RS. The relationship between sexual dimorphism in tooth size and body size as studied within families. *Arch Oral Biol.* 1967; 12 (2): 299–301. Available from: [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(67\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0003-9969(67)90050-7).
27. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis.

- Palaeontologia Electronica. 2001; 4 (1): 1–9.
28. Grzhibovsky AM. Analiz trex i bolee nezavisimyx grupp dannyx. Ehkologiya. 2008; 3: 50–58. Russian.
29. Rebrova OYu. Statisticheskij analiz medicinskix dannyx. Primenenie paketa prikladnyx programm STATISTICA. M.: Mediasfera, 2002; 312 s. Russian.
30. Zyul'kina LA. Polovoj dimorfizm odontometricheskix xarakteristik u zhitelej Penzenskogo regiona 21–36 let v zavisimosti ot parametrov kranio-facial'nogo kompleksa (dissertaciya). Volgograd, 2011; 23 s. Russian.



## ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ ПРОЛЕКАРСТВА НА ОСНОВЕ АМИКУМАЦИНА А

В. И. Шмыгарев<sup>1</sup>, Ю. А. Прокопенко<sup>1</sup>, С. С. Терехов<sup>1</sup>, М. Ю. Захарова<sup>1</sup>, М. А. Дубинный<sup>1</sup>, И. В. Смирнов<sup>1</sup>, И. В. Ямпольский<sup>1,2</sup>, А. С. Царькова<sup>1,2</sup> ✉<sup>1</sup> Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Современная коронавирусная болезнь COVID-19, вызываемая вирусом SARS-CoV-2, характеризуется высокой контагиозностью и тяжелым течением. Оказание помощи пациентам с COVID-19 требует разработки новых видов противовирусных препаратов. Цель работы — разработать пролекарство для лечения коронавирусной болезни с применением антибиотика Амикумацина А (Ami), механизм действия которого основан на ингибировании трансляции. Ферментативный гидролиз инактивированного пролекарства основной протеазой SARS-CoV-2 может привести к высвобождению активной молекулы Ami и как следствие к подавлению биосинтеза белка в инфицированных клетках. Для проверки предложенной гипотезы был осуществлен пятистадийный синтез инактивированного аналога Амикумацина А, *in vitro* тестирование которого с рекомбинантной протеазой M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2 показало низкий процент гидролиза. Дальнейшая оптимизация пептидного фрагмента инактивированного аналога, распознаваемого протеазой M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2, возможно, приведет к повышению протеолиза и высвобождению Амикумацина А.

**Ключевые слова:** трансляция, ингибитор трансляции, противовирусные препараты, пролекарства, инактивированные производные Амикумацина

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2021-1049.

**Вклад авторов:** Ю. А. Прокопенко — наработка и выделение Амикумацина; В. И. Шмыгарев — полный синтез инактивированного аналога Амикумацина А; С. С. Терехов, М. Ю. Захарова — проведение *in vitro* экспериментов с протеазой M<sup>Pro</sup>; М. А. Дубинный — ЯМР-спектроскопия и анализ данных; А. С. Царькова — анализ литературы, обработка данных, написание статьи; И. В. Ямпольский, И. В. Смирнов — общее руководство проектом.

**Соблюдение этических стандартов:** работа проведена с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ **Для корреспонденции:** Александра Сергеевна Царькова  
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997, Россия; [altsarkova@gmail.com](mailto:altsarkova@gmail.com)

**Статья получена:** 15.11.2022 **Статья принята к печати:** 20.12.2022 **Опубликована онлайн:** 30.12.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.073

## AMICOUMACIN-BASED PRODRUG DEVELOPMENT APPROACH

Shmygarev VI<sup>1</sup>, Prokopenko YuA<sup>1</sup>, Terkhov SS<sup>1</sup>, Zakharova MYu<sup>1</sup>, Dubinnyi MA<sup>1</sup>, Smirnov IV<sup>1</sup>, Yampolsky IV<sup>1,2</sup>, Tsarkova AS<sup>1,2</sup> ✉<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Coronavirus disease COVID-19, caused by the SARS-CoV-2 virus, is highly contagious and has a severe morbidity. Providing care to patients with COVID-19 requires the development of new types of antiviral drugs. The aim of this work is to develop a prodrug for the treatment of coronavirus disease using the antibiotic Amicoumacin A (Ami), the mechanism of action of which is based on translation inhibition. Enzymatic hydrolysis of an inactivated prodrug by the SARS-CoV-2 main protease can lead to the release of the active Ami molecule and, as a consequence, the suppression of protein biosynthesis in infected cells. To test the proposed hypothesis, a five-stage synthesis of an inactivated analogue of Amicoumacin A was carried out. Its *in vitro* testing with the SARS-CoV-2 recombinant protease M<sup>Pro</sup> showed a low percentage of hydrolysis. Further optimization of the peptide fragment of the inactivated analog recognized by the SARS-CoV-2 M<sup>Pro</sup> protease may lead to an increase in proteolysis and the release of Amicoumacin A.

**Keywords:** translation, translation inhibitor, antiviral agents, prodrugs, inactivated amicoumacin derivatives

**Funding:** the work was supported by the grant № 075-15-2021-1049 from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

**Author contribution:** Prokopenko YuA — production and isolation of Amikomacin; Shmygarev VI — complete synthesis of an inactivated analog of Amicoumacin A; Terkhov SS, Zakharova MYu — *in vitro* experiments with M<sup>Pro</sup> protease; Dubinnyi MA — NMR spectroscopy and data analysis; Tsarkova AS — literature analysis, data processing, article writing; Yampolsky IV, Smirnov IV — general project management.

**Compliance with ethical standards:** the work was carried out in compliance with the principles of the Helsinki Declaration of the World Medical Association.

✉ **Correspondence should be addressed:** Aleksandra S. Tsarkova  
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997, Russia; [altsarkova@gmail.com](mailto:altsarkova@gmail.com)

**Received:** 15.11.2022 **Accepted:** 20.12.2022 **Published online:** 30.12.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.073

Коронавирусная болезнь 2019 г. (COVID-19) вызвала катастрофические проблемы в системе здравоохранения и экономике во многих странах мира [1]. Хотя несколько вакцин эффективно замедлили распространение вируса SARS-CoV-2, их долгосрочная защита и эффективность против вариантов вируса все еще неясны [2–5]. Вспышки эпидемий вызванных коронавирусами в 2002 и 2012 г. послужили мощным толчком для фармацевтических и биотехнологических исследований, однако лишь в 2021 г. появились первые лекарственные кандидаты, успешно прошедшие клинические испытания [6, 7]. Несмотря на то что массовая вакцинация сильно снижает эффективность распространения и летальность вирусной инфекции, остающиеся высокими уровни заболеваемости

и смертности [8, 9] требуют разработки новых противовирусных препаратов для лечения COVID-19.

Привлекательной молекулярной мишенью для новых противовирусных препаратов является трансляционная машинария инфицированной клетки. В этом исследовании высокоэффективный трансляционный ингибитор Амикумацин А (Ami), впервые выделенный из грамположительных бактерий *Bacillus pumilus* [10], использовался для разработки пролекарства против SARS-CoV-2. Одним из подходов к направленной терапии коронавирусной инфекции может являться протеолитическая активация пролекарства на основе Ami. Последовательность узнавания основной протеазы M<sup>Pro</sup> позволяет использовать подходы таргетного

высвобождения активной молекулы  $\text{Ami}$  и последующего ингибирования трансляции. Целью исследования стала разработка инактивированного аналога Амикумацина А, представляющего собой многообещающий инструмент для создания лекарств, нацеленных на специфическое подавление трансляции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Спектры ЯМР ( $\delta$ , м.д.; J, Гц) регистрировали на приборе Bruker Fourier 300 (300 МГц; США) и Bruker Avance I (700 МГц, США) при 303 К в  $\text{CDCl}_3$  и  $\text{DMSO}-d_6$ , внутренний стандарт — ТМС. Масс-спектры регистрировали на приборе Waters ACQUITY UPLC H-Class LC/MS System (Waters; США) методом электрораспылительной ионизации (ESI). Температуры плавления определяли на приборе SMP30 и не исправляли. Аналитическую и препаративную тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Merck (Германия) с флуоресцентным индикатором UV-254. Для колоночной хроматографии использовали силикагель фирмы Merck (Kieselgel 60, 70-230 mesh). Реактивы Acros Organics (Thermo Fisher Scientific; Бельгия) и SigmaAldrich (Merck; Германия) применяли без дополнительной очистки. Для проведения реакций использовали свежеперегнанные растворители фирмы Химмед (Россия).

### Синтез инактивированного производного Амикумацина А

#### *Диметиловый эфир N-третбут оксикарбонил-L-глутаминовой кислоты (1)*

В 75 мл метанола суспендировали 14,7 г (0,10 моль) L-глутаминовой кислоты и добавили прикапыванием 25 мл (0,20 моль) триметилсилилхлорида при комнатной температуре. Осадок постепенно растворился. Реакционную смесь оставили на ночь при комнатной температуре. На следующий день упарили растворитель. К остатку прибавили 75 мл метанола, 40 мл (0,3 моль) триэтиламина и 22 г (0,1 моль) ди-трет-бутилкарбоната. Оставили реакционную массу при комнатной температуре на сутки. Контроль методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) этилацетат : гексан — 1 : 1 ( $R_f = 0,36$ ). Далее упарили растворитель, разбавили смесь 200 мл воды и экстрагировали 3 × 50 мл этилацетата. Органический слой промыли водой, 5%-ным раствором соляной кислоты, 5%-ным раствором поташа и снова водой. После высушивания над сульфатом натрия упарили растворитель. Получили 23 г продукта 1 в виде бесцветного вязкого масла, выход 85%.

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.09(s, br, 1H), 4.32(s, br, 1H), 3.73(s, 3H), 3.67(s, 3H), 2.47-2.31(m, 2H), 2.24-2.10(m, 1H), 2.03-1.85(m, 1H), 1.43(9H, s).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.2, 172.6, 155.3, 80.0, 52.9, 52.4, 51.8, 30.0, 28.3, 27.8

MS (EI): m/z, 276.2 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ].

#### *Диметил(2S,4R)-2-[(трет-бутоксикарбонил)-амино]-(цианометил)пентандиоат (2)*

К раствору 7,5 г (27,3 ммоль) диметилового эфира N-третбутоксикарбонил-L-глутаминовой кислоты (1) в 50 мл сухого тетрагидрофурана (ТГФ) при  $-80^\circ\text{C}$  добавили 60 мл (60 ммоль) 1M раствора LiHMDS в ТГФ. Выдержали реакционную массу при этой температуре

1 ч и далее медленно прибавили раствор 1,9 мл (27,3 моль) бромацетонитрила в 10 мл сухого ТГФ, так чтобы температура не поднималась выше  $-70^\circ\text{C}$ . Контроль ТСХ этилацетат : гексан — 1 : 1 ( $R_f = 0,48$ ). Через 40 мин к смеси добавили 1M раствор HCl при  $-70^\circ\text{C}$  до нейтрального значения pH, затем упарили органический слой. Остаток растворили в 100 мл смеси вода-бензол (1 : 1). Органический слой упарили и хроматографировали остаток на силикагеле, элюент — петролейный эфир : этилацетат (3 : 1). Получили 5 г продукта 2 с выходом 58%.

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.10(s, br, 1H), 4.38(s, br, 1H), 3.75(s, 3H), 3.74(s, 3H), 2.9-2.7(m, 3H), 2.25-2.05(m, 2H), 1.43(9H, s).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.4, 172.0, 155.5, 117.1, 80.6, 52.7, 52.6, 51.0, 38.3, 33.9, 28.3, 19.0

MS (EI): m/z, 287.2 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ].

#### *Метил(2S)-2-[(трет-бутоксикарбонил)амино]-3-[(3S)-2-оксипирролидин-3-ил]пропаноат (3)*

В 40 мл метанола растворили 2 г (6,4 ммоль) цианметильного производного 2 и 0,83 г (6,4 ммоль) хлорида кобальта. При охлаждении до  $-10^\circ\text{C}$  порциями присыпали 2,2 г (57 ммоль) сухого боргидрида натрия. После каждой порции смесь приобретала черную окраску и затем снова светлела. Через сутки при комнатной температуре по данным масс-спектрометрии LC/MS реакция доходит до конца. Органический растворитель упарили, остаток суспендировали в этилацетате и пропустили через тонкий слой силикагеля, упарили растворитель и остаток хроматографировали на силикагеле, элюент — этилацетат ( $R_f = 0,16$ ). Получили 1,0 г кристаллического вещества 3 с выходом 55% и т.пл.  $114^\circ\text{C}$

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.42(s, br, 1H), 5.54(d, 8.4 Hz, 1H), 4.30(m, 1H), 3.72(s, 3H), 3.37-3.27(m, 2H), 2.50-2.35(m, 2H), 2.15-2.05(m, 1H), 1.90-1.75(m, 2H), 1.42(9H, s).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.7, 172.9, 155.7, 79.9, 52.4, 52.3, 40.3, 38.1, 34.1, 28.3, 28.1

MS (EI): m/z, 315.3 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ].

#### *Метил(2S)-2-{[2-(бензилоксикарбониламино)-4-метилпентаноил]амино}-3-[(3S)-2-оксипирролидин-3-ил]пропаноат (4)*

В 0,3 мл хлористого метилена растворили 30 мг (0,104 ммоль) эфира 3 и прибавили 0,2 мл трифторуксусной кислоты. Через 30 мин при комнатной температуре по ТСХ происходит исчезновение исходного вещества. Трифторуксусную кислоту упарили на ротормном испарителе. Полученную трифторацетатную соль растворили в 1 мл хлористого метилена, прибавили 33 мг (0,13 ммоль) Cbz-L-лейцина, 40 мг (0,13 ммоль) TBUT, 15 мг (0,13 ммоль) N-гидроксibenзотриазола и охладили до  $0^\circ\text{C}$ . В реакционную смесь добавили 0,11 мл (0,62 ммоль) диизопропилэтиламина. Смесь выдержали в холодильнике в течение ночи. Обработали реакционную массу смесью раствора поташа и этилацетатом, органический слой промыли водой и упарили. Остаток хроматографировали на силикагеле, элюент хлороформ: метанол 95/5 ( $R_f = 0,14$ ). Получили 30 мг продукта 4 в виде желтоватого вязкого масла, выход 66%.

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.96 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.40-7.21(m, 5H), 6.64 (s, 1H), 5.56(d, 9.0, 1H), 5.07(s, 2H), 4.54-4.30 (m, 2H), 3.70(s, 3H), 3.36-3.18(m, 2H), 2.47-2.27(m, 2H), 2.26-2.11(m, 1H), 1.82-1.59(m, 4H), 1.57-1.43(m, 1H), 0.95(d, 6.1 Hz, 6H)

Таблица 1. Химические сдвиги  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  целевого соединения 5. DMSO- $d_6$ , 700 МГц. Нумерация атомов показана на рис. 2.

Ост.	Атом	<sup>1</sup> H, м.д.	<sup>13</sup> C, м.д.	Ост.	Атом	<sup>1</sup> H, м. д.	<sup>13</sup> C, м. д.
Ami	3	4.694	81.52	Leu	NH	7.428	–
	4	2.856	29.53		2	4.037	53.73
		3.083			3	1.449	40.96
	5	6.819	118.92		4	1.608	24.69
	6	7.478	136.71		5	0.838	21.88
	7	7.411	115.69		6	0.858	23.45
	1'	0.872	22.09	CG	NH	8.032	–
	2'	0.918	23.76		2	4.312	51.37
	3'	1.683	24.48		3	1.535	34.25
	4'	1.365	39.57			1.959	
		1.688			4	2.248	37.39
	5'	4.213	48.60		5	1.645	27.71
	6'-NH	7.782	–			2.097	
	8'	3.845	72.32		6	3.035	39.91
	9'	3.609	74.25			3.106	
	10'	4.264	48.31		7-NH	7.558	–
	10'-NH	7.805	–	Cbz	1	5.023	65.80
	11'	2.326	35.25		3,7	7.342	128.00
		2.448			4,6	7.358	128.40
					5	7.308	128.16

$^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.9, 173.0, 172.2, 156.1, 136.3, 128.5, 128.1, 127.9, 66.8, 53.3, 52.4, 51.4, 42.4, 40.5, 38.3, 32.9, 28.1, 24.6, 22.9, 22.1.

MS (EI): m/z, 434.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Бензил(1-(((S)-1-(((3S,4S,5S)-1-амино-4,5-дигидрокси-6-(((S)-1-((S)-8-гидрокси-1-оксихроман-3-yl)-3-метилбутил)амино)-1,6-диоксогексан-3-ил)амино)-1-оксо-3-((S)-2-оксопирролидин-3-ил)пропан-2-ил)амино)-4-метил-1-оксопентан-2-ил)карбамат (5)

Растворили 4 мг (9 мкмоль) эфира дипептида 4 в 0,1 мл метанола и прибавили 0,02 мл (20 мкмоль) 1М раствора LiOH в воде. Через 1 ч при комнатной температуре по данным LCMS реакция прошла. Нейтрализовали смесь 0,02 мл 1М раствора соляной кислоты, упарили растворители на роторном испарителе. Полученную кислоту растворили в 0,1 мл ДМФА, прибавили 3 мг (6 мкмоль) трифторацетата Амикумацина А, 3,8 мг (11,7 мкмоль) TBUTU, 6,2 мг (6 мкмоль) N-гидроксибензотриазола и охладили до 0 °С. К реакционной массе прибавили 0,01 мл (54 мкмоль) диизопропилэтиламина. Через сутки реакционную смесь разбавили водой и экстрагировали этилцетатом, после упаривания органического растворителя продукт выделили препаративной ТСХ на силикагеле, элюент этилацетат: метанол 85/15 ( $R_f = 0,3$ ). Получили 0,5 мг продукта 5 в виде смеси диастереомеров (3:1). Выход составил 10%.

$^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР DMSO- $d_6$ : см. табл. 1.

MS (EI): m/z, 825,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### Наработка и выделение Амикумацина А

В исследовании использовали штамм *Bacillus pumilus* BKM B-3464D (Патент RU2737856C1) [11], альтернативное название *Bacillus pumilus* strain 124, GenBank: QENN000000000.1, изолированный в 2017 г. [12]. *B. pumilus* (GenBank: QENN000000000.1), продуцирующий Ami,

культивировали при 28 °С в среде SYC, содержащей 40 г/л сахарозы, 5 г/л дрожжевого экстракта, 4 г/л  $\text{CaCO}_3$ , 1,5 г/л  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2 г/л глюкозы, 2 г/л NaCl, 1,5 г/л  $\text{MgSO}_4$ , 2 г/л  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01 г/л  $\text{FeSO}_4$ , 0,01 г/л  $\text{MnCl}_2$ . *B. pumilus* инокулировали из ночной культуры (используя разведение 1 : 100) и культивировали в колбах на 750 мл в 100 мл среды на термостатируемой качалке с интенсивностью качания 250 об./мин. Клетки центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин, а супернатант фильтровали с использованием фильтра Millistak + HC Pod Depth Filter (Millipore, Billerica; США).

Выделение Ami включало три хроматографических стадии. На первом этапе супернатант очищали методом твердофазной экстракции с сорбентом LPS-500 («Техносорбент»; Россия) на колонке XK 26 (GE Healthcare Life Sciences; США) с использованием буфера А (10 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH 5.0, 5% ACN), буфер В (10 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH 5.0, 80% ACN), скорость потока 6 мл/мин, ступенчатый градиент 0–10 мин (0% В), 10–20 мин (20% В), 20–36 мин (40% В) и 36–45 мин (100% В). Фракции, содержащие Ami (40% В), лиофилизировали, растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и дважды фракционировали на колонке RP-HPLC Zorbax ODS 62 × 250 мм (Agilent; США) с использованием буфера А и В, скорость потока 5 мл/мин, градиент 0–10 мин (0% В), 10–24 мин (0–70% В), 24–25 мин (70–100% В). Наконец, Ami очищали на колонке Symmetry C18 5 мкм 4,6 × 150 мм (Waters; США) RP-HPLC с использованием буфера А и В, скорость потока — 1 мл/мин, градиент — 0–5 мин (0% В), 5–20 мин (0–100% В). Мониторинг Амикумацина А контролировали по поглощению при 315 нм. Концентрацию Ami измеряли с использованием  $\epsilon_{\text{MeOH}}^{315\text{nm}} = 4380 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### Экспрессия и очистка протеазы

Кодон-оптимизированная последовательность гена, кодирующего полноразмерный  $\text{M}^{\text{Pro}}$  SARS-CoV-2,

слитого с последовательностью 6×His на C-конце и с белком GST на N-конце в плазмиде pGEX6p [13], был любезно предоставлен профессором Рольфом Хильгенфельдом. Кодированный M<sup>Pro</sup> ген был фланкирован последовательностями двух протеазных сайтов для последующего процессирования полноразмерной M<sup>Pro</sup>: сайт узнавания M<sup>Pro</sup> для автопроцессинга (на N-конце последовательности) и сайт протеазы PreScission™ непосредственно перед 6×His для его удаления, как описано ранее [13]. Полноразмерный белок M<sup>Pro</sup> был получен в клетках *E. coli* BL21(DE3) и очищен в соответствии с методикой [13]. Белок GST-M<sup>Pro</sup> самопроцессировался во время экспрессии. M<sup>Pro</sup>-His очищали с помощью металл-хелатной хроматографии с использованием сорбента TALON (Clontech; США) и обрабатывали PreScission™ Pro (соотношение M<sup>Pro</sup> и PreScission как 100:1) на 48 ч при 4 °C для удаления 6×His и получения M<sup>Pro</sup> с интактным C-концом. Смесь M<sup>Pro</sup> с PreScission™ Pro была очищена с использованием сорбентов GST-Sepharose (Amersham Biosciences, Германия) и TALON (Clontech; США) IMAC. Вестерн-блот анализ с использованием антител к 6×His показал, что последовательность 6×His была полностью удалена. M<sup>Pro</sup> концентрировали до 10 мг/мл в 50 мМ Трис-HCl pH 7.5.

#### Анализ активации пролекарства Cbz-Leu-CG-Ami протеазой M<sup>Pro</sup>

Удельная активность M<sup>Pro</sup> была оценена с использованием FRET-субстрата (FRET-S), Dabcyl-KTSAVLQ↓SGFRKM-E(Edans)-NH<sub>2</sub> (BPS Bioscience, США) и соответствовала чистому препарату M<sup>Pro</sup> [14]. Протеолиз пролекарства проводили в присутствии 0.1–1 мкМ M<sup>Pro</sup> в реакционном буфере (20 мМ Tris-HCl pH 7.3, 100 мМ NaCl, 1.0 мМ ЭДТА и 1.0 мМ DTT) с использованием 10 мкМ Cbz-Leu-CG-Ami при температуре 30 °C. Продукты реакции анализировали с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ, согласно описанной ранее методике [15]. Амикумацин А и его производные детектировали по поглощению при длине волны 315 нм. Концентрацию оценивали с использованием стандарта Ami,  $\epsilon_{\text{MeOH}}^{315\text{nm}} = 4380 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### Оценка клеточной цитотоксичности

Цитотоксичность оценивали с помощью МТТ-теста с использованием и клеточной линии HEK-293 (ATCC; США). Клетки A549 высевали в количестве  $2 \times 10^5$  кл./лунка в 96-луночный микропланшет в среду DMEM (Gibco, Invitrogen; США) с 2 мМ L-глутамин (Invitrogen; США), 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco; США) и инкубировали при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. После инкубации среду удаляли. Затем клетки обрабатывали свежей средой, содержащей варьируемые концентрации Амикумацина А и аналога Cbz-Leu-CG-Ami в диапазоне 0,01–50 мкг/мл в течение 48 ч. После этой процедуры среду удаляли и клетки обрабатывали в течение 2 ч реагентом МТТ (концентрация 2,5 мг/мл). Живые клетки превращали МТТ в формазан, приобретающий синевато-фиолетовый цвет при растворении в ДМСО. Раствор удаляли и добавляли 200 мкл ДМСО для растворения формазана. Оптическое поглощение обработанных клеток и контрольных (необработанных) клеток измеряли при 570 нм с использованием планшетного ридера Variskap Flash (Thermo Fischer Scientific; США). Выживаемость

оценивали как отношение оптической плотности обработанных клеток к контрольным, измеренной в каждом эксперименте.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения пептида, имитирующего сайт узнавания протеазы M<sup>Pro</sup> [16], был синтезирован аналог глутамин (циклоглутамин) 3 в четыре стадии с общим выходом 27% из глутаминовой кислоты [17, 18]. Алкилирование диэфира глутаминовой кислоты 1 протекает стереоселективно, однако наблюдается неполная конверсия исходного диэфира (рис. 1). Продукт реакции 2 очищали колоночной хроматографией на прямой фазе. Восстановление нитрила проводили боргидридом натрия в метаноле при –10 °C. В процессе восстановления в результате конкурирующей реакции происходит димеризация 2 с образованием вторичного амина (~15–20%), который легко отделяется при хроматографической очистке.

После снятия Вос-группы с 3, последующего ацилирования в присутствии конденсирующего агента TBTU [16] Cbz-лейцином и гидролиза сложного эфира был получен дипептид 4, содержащий метильную защитную группу на карбоксильном фрагменте (рис.1).

Амикумацин А является особенно мощным ингибитором трансляции как у про-, так и у эукариот [19, 20]. В природе Ami продуцируется пробиотическими штаммами *Bacillus pumilus* [10, 12], опосредующими их противомикробную активность. Для данного исследования Амикумацин А был получен наработкой в бактериях *B. pumilus* по методу, описанному ранее [21].

На заключительной стадии синтеза после количественного удаления метильной защиты раствором щелочи в воде дипептид 4 без дополнительной очистки был введен в конденсацию с Амикумацином А в присутствии TBTU (рис. 1). Целевой продукт Cbz-Leu-CG-Ami 5 очищенный методом препаративного ТСХ был получен в виде смеси диастереомеров (3 : 1). Для целевого продукта 5 были зарегистрированы спектры ЯМР 1D <sup>1</sup>H, 2D <sup>13</sup>C-HSQC (с редактированием спектра в соответствии с мультиплетностью сигналов) и 2D TOCSY (Bruker Avance I 700 МГц). Анализ спектров ЯМР позволил выделить спиновые системы и после сравнения со спектрами двух исходных фрагментов (Амикумацина А и дипептида 4) однозначно отнести химические сдвиги протонов и связанных с ними через одну химическую связь атомов <sup>13</sup>C (табл. 1 и рис. 2). Модификация Амикумацина А по 10'-NH<sub>2</sub> привела к изменению химических сдвигов атома углерода 10' (–2.56 м.д.) и соседних атомов 9' и 11' (+1.52 и +1.57 м.д. соответственно).

В результате был синтезирован инактивированный аналог Ami 5 для последующего тестирования на возможную активацию полученного соединения протеазой M<sup>Pro</sup> SARS-CoV-2. В отличие от исходного Амикумацина А, обладающего высокоэффективным антипролиферативным действием (IC<sub>50</sub> = 0,06 ± 0,02 мкг/мл) [19, 22], модифицированное производное Cbz-Leu-CG-Ami 5 не ингибировало рост клеток вплоть до повышения концентрации 50 мкг/мл. Несмотря на то что последовательность пептида Cbz-Leu-CG позволяет высокоэффективно осуществлять таргетирование M<sup>Pro</sup> [16], молекула Cbz-Leu-CG-Ami была стабильна в присутствии протеазы M<sup>Pro</sup>. Было показано, что менее 3% свободного Амикумацина А может быть высвобождено в присутствии 1 мкМ M<sup>Pro</sup> ([S]/[E]=10–100) в течение 4 ч.



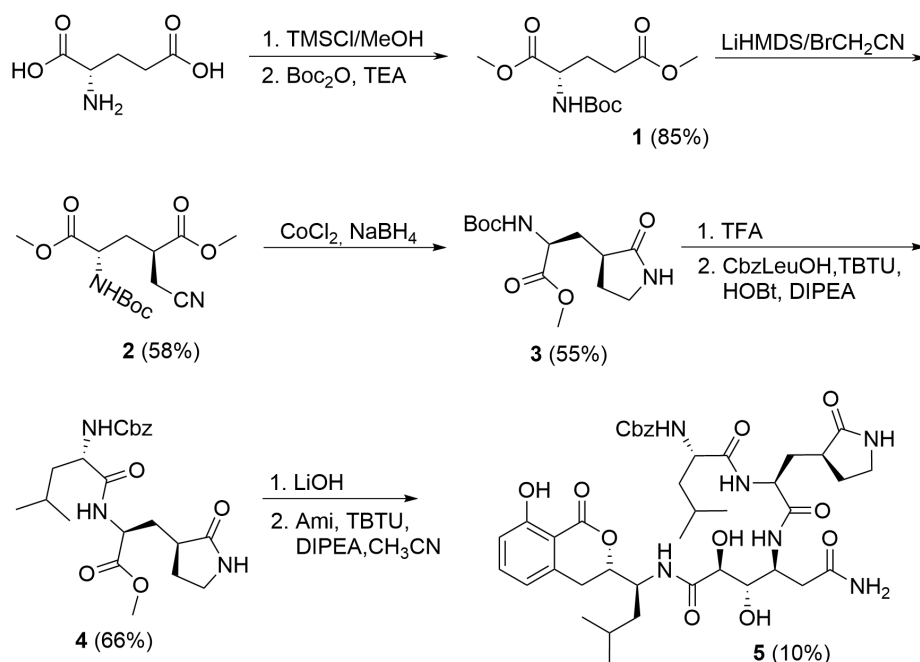


Рис. 1. Полный синтез целевого инактивированного Амикумацина 5

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Появление COVID-19 в 2019 г. поставило перед специалистами здравоохранения задачи, связанные с быстрой диагностикой и оказанием медицинской помощи больным. В настоящее время большинство препаратов, используемых для терапии COVID-19, неспецифичны, имеют большое число серьезных побочных эффектов и применимы только в экстренных случаях [23]. Лишь два SARS-CoV-2-специфичных лекарственных кандидата успешно прошли клинические испытания [6, 7], один из которых нашел сегодня применение в лекарственном препарате нирматрелвир [23]. В настоящее время продолжается интенсивное изучение клинических и эпидемиологических особенностей коронавирусного заболевания, разработка новых средств его профилактики и лечения.

Результаты оценки клеточной цитотоксичности полученного в настоящем исследовании конъюгата Cbz-Leu-CG-Ami 5 на клеточной линии HEK-293 показывают снижение  $IC_{50}$  инактивированного амикумацина на несколько порядков по сравнению с исходным Ami, что говорит о том, что, несмотря на высокую эффективность природного Амикумацина А в ингибировании эукариотической трансляции, на его основе могут быть созданы инактивированные аналоги, последующая специфическая активация которых позволит осуществлять направленное терапевтическое воздействие. Однако скорость протеолиза синтетического производного Cbz-Leu-CG-Ami более чем на четыре порядка ниже скорости протеолиза, характерной для природных субстратов, что свидетельствует о необходимости дальнейшей оптимизации полученной молекулы. Введение заместителей в P1'-положение является критичным для

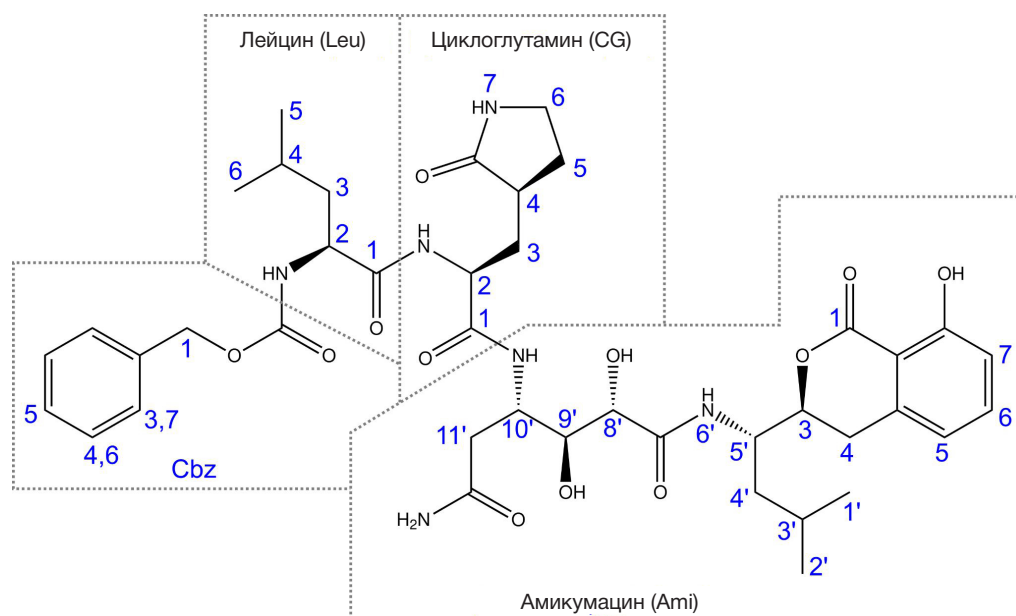


Рис. 2. Нумерация атомов соединения 5 в таблице 1

функционирования многих протеаз, что, по-видимому, характерно и для M<sup>Pro</sup> и требует дополнительного введения адаптерных последовательностей.

## ВЫВОДЫ

Разработка лекарственных препаратов, нацеленных на специфические клеточные мишени и механизмы, лежит в основе успешного лечения вирусных заболеваний. В представленной работе предложена разработка нового инактивированного аналога природного ингибитора биосинтеза белка Амикумадина А, модифицированного

пептидной последовательностью Cbz-Leu-CG, узнаваемой основной протеазой M<sup>Pro</sup> вируса SARS-CoV-2. Исследование способности синтетического аналога Ами к активации основной протеазой SARS-CoV-2 выявило принципиальную возможность создания пролекарства с указанным принципом действия, однако наблюдавшийся низкий уровень гидролиза свидетельствует о необходимости дальнейшей модификации полученной молекулы. Оптимизация структуры и увеличение активности новых аналогов Амикумадина А представляют, на наш взгляд, перспективный подход для разработки лекарственных кандидатов для лечения COVID-19.

## Литература

- Kolahchi Z, De Domenico M, Uddin LQ, Cauda V, Grossmann I, Lacasa L, et al. COVID-19 and Its Global Economic Impact. *Adv Exp Med Biol.* 2021; 1318: 825–37.
- Marabotti C. Efficacy and effectiveness of covid-19 vaccine — absolute vs. relative risk reduction. *Expert Rev Vaccines.* 2022; 21 (7): 873–75.
- Olliaro P, Torreele E, Vaillant M. COVID-19 vaccine efficacy and effectiveness—the elephant (not) in the room. *The Lancet Microbe.* 2021; 2 (7): e279–e280.
- Knoll MD, Wonodi C. Oxford-AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy. *Lancet.* 2021; 397 (10269): 72–74.
- Jones I, Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet.* 2021; 397 (10275): 642–3.
- Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, Aschenbrenner L, Avery M, Berritt S, et al. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science.* 2021; 374: 1586–93.
- de Vries M, Mohamed AS, Prescott RA, Valero-Jimenez AM, Desvignes L, O'Connor R, et al. A comparative analysis of SARS-CoV-2 antivirals characterizes 3CLpro inhibitor PF-00835231 as a potential new treatment for COVID-19. *J Virol.* 2021; 95 (10): e01819–20.
- Saban M, Kaim A, Myers V, Wilf-Miron R. COVID-19 Vaccination, Morbidity, and Mortality During a 12-Month Period in Israel: Can We Maintain a “Herd Immunity” State? *Popul Health Manag.* 2022; 25 (5): 684.
- Stepanova M, Lam B, Younossi E, Felix S, Ziayee M, Price J, et al. The impact of variants and vaccination on the mortality and resource utilization of hospitalized patients with COVID-19. *BMC Infect Dis.* 2022; 22: 702.
- Itoh J, Omoto S, Shomura T, Nishizawa N, Miyado S, Yuda Y, et al. Amicoumacin-A, a new antibiotic with strong antiinflammatory and antiulcer activity. *J Antibiot (Tokyo).* 1981; 34 (5): 611–3.
- Терехов С. С., Мокрушина Ю. А., Смирнов И. В., Габибов А. Г. Штамм *Bacillus pumilus*, продуцирующий антибиотик широкого спектра действия амикумадин. RU2737856C1, 2020. Доступно по ссылке: <https://patents.google.com/patent/RU2737856C1/en?q=RU2737856C1>.
- Terekhov SS, Smirnov IV, Malakhova MV, Samoilov AE, Manolo AI, Nazarov AS, et al. Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018; 115 (38): 9551–6.
- Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved  $\alpha$ -ketoamide inhibitors. *Science.* 2020; 368 (6489): 409–12.
- Zakharova MY, Kuznetsova AA, Uvarova VI, Fomina AD, Kozlovskaya LI, Kaliberda EN, et al. Pre-Steady-State Kinetics of the SARS-CoV-2 Main Protease as a Powerful Tool for Antiviral Drug Discovery. *Front Pharmacol.* 2021; 12: 3243.
- Baranova MN, Kudzhaev AM, Mokrushina YA, Babenko VV, Kornienko MA, Malakhova MV, et al. Deep Functional Profiling of Wild Animal Microbiomes Reveals Probiotic *Bacillus pumilus* Strains with a Common Biosynthetic Fingerprint. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (3): 1168.
- Vuong W, Khan MB, Fischer C, Arutyunova E, Lamer T, Shields J, et al. Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. *Nat Commun.* 2020; 11: 4282.
- Schädel N, Icik E, Martini M, Altevogt L, Ramming I, Greulich A, et al. Synthesis of Imidazole and Histidine-Derived Cross-Linkers as Analogues of GOLD and Desmosine. *Synthesis (Stuttg).* 2021; 53 (13): 2260–8.
- Mou K, Xu B, Ma C, Yang X, Zou X, Lü Y, et al. Novel CADD-based peptidyl vinyl ester derivatives as potential proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008; 18 (6): 2198–202.
- Prokhorova IV, Akulich KA, Makeeva DS, Osterman IA, Skvortsov DA, Sergiev PV, et al. Amicoumacin A induces cancer cell death by targeting the eukaryotic ribosome. *Sci Rep.* 2016; 6: 27720.
- Maksimova EM, Vinogradova DS, Osterman IA, Kasatsky PS, Nikonov OS, Milón P, et al. Multifaceted Mechanism of Amicoumacin A Inhibition of Bacterial Translation. *Front Microbiol.* 2021; 12: 618857.
- Terekhov SS, Nazarov AS, Mokrushina YA, Baranova MN, Potapova NA, Malakhova MV, et al. Deep functional profiling facilitates the evaluation of the antibacterial potential of the antibiotic amicoumacin. *Antibiotics.* 2020; 9: 157.
- Terekhov SS, Mokrushina YA, Nazarov AS, Zlobin A, Zalevsky A, Bourenkov G, et al. A kinase bioscavenger provides antibiotic resistance by extremely tight substrate binding. *Sci Adv.* 2020; 6 (26): eaaz9861.
- Therapeutics and COVID-19: living guideline, Geneva: World Health Organization c2022 [cited 2022 Dec 19]. Available from: <https://app.magicapp.org/#/guideline/nBkO1E/section/nYJyL>.

## References

- Kolahchi Z, De Domenico M, Uddin LQ, Cauda V, Grossmann I, Lacasa L, et al. COVID-19 and Its Global Economic Impact. *Adv Exp Med Biol.* 2021; 1318: 825–37.
- Marabotti C. Efficacy and effectiveness of covid-19 vaccine — absolute vs. relative risk reduction. *Expert Rev Vaccines.* 2022; 21 (7): 873–75.
- Olliaro P, Torreele E, Vaillant M. COVID-19 vaccine efficacy and effectiveness—the elephant (not) in the room. *The Lancet Microbe.* 2021; 2 (7): e279–e280.
- Knoll MD, Wonodi C. Oxford-AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy. *Lancet.* 2021; 397 (10269): 72–74.
- Jones I, Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet.* 2021; 397 (10275): 642–3.
- Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, Aschenbrenner L, Avery M,

- Berritt S, et al. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science*. 2021; 374: 1586–93.
7. de Vries M, Mohamed AS, Prescott RA, Valero-Jimenez AM, Desvignes L, O'Connor R, et al. A comparative analysis of SARS-CoV-2 antivirals characterizes 3CLpro inhibitor PF-00835231 as a potential new treatment for COVID-19. *J Virol*. 2021; 95 (10): e01819–20.
  8. Saban M, Kaim A, Myers V, Wilf-Miron R. COVID-19 Vaccination, Morbidity, and Mortality During a 12-Month Period in Israel: Can We Maintain a “Herd Immunity” State? *Popul Health Manag*. 2022; 25 (5): 684.
  9. Stepanova M, Lam B, Younossi E, Felix S, Ziayee M, Price J, et al. The impact of variants and vaccination on the mortality and resource utilization of hospitalized patients with COVID-19. *BMC Infect Dis*. 2022; 22: 702.
  10. Itoh J, Omoto S, Shomura T, Nishizawa N, Miyado S, Yuda Y, et al. Amicoumacin-A, a new antibiotic with strong antiinflammatory and antiulcer activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 1981; 34 (5): 611–3.
  11. Terekhov SS, Mokrushina YuA, Smirnov IV, Gabibov AG. *Bacillus pumilus* strain producing wide-spectrum antibiotic Amikumacin. RU2737856C1, 2020. <https://patents.google.com/patent/RU2737856C1/en?q=RU2737856C1>.
  12. Terekhov SS, Smirnov IV, Malakhova MV, Samoilov AE, Manolo AI, Nazarov AS, et al. Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115 (38): 9551–6.
  13. Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved  $\alpha$ -ketoamide inhibitors. *Science*. 2020; 368 (6489): 409–12.
  14. Zakharova MY, Kuznetsova AA, Uvarova VI, Fomina AD, Kozlovskaya LI, Kaliberda EN, et al. Pre-Steady-State Kinetics of the SARS-CoV-2 Main Protease as a Powerful Tool for Antiviral Drug Discovery. *Front Pharmacol*. 2021; 12: 3243.
  15. Baranova MN, Kudzhaev AM, Mokrushina YA, Babenko VV, Kornienko MA, Malakhova MV, et al. Deep Functional Profiling of Wild Animal Microbiomes Reveals Probiotic *Bacillus pumilus* Strains with a Common Biosynthetic Fingerprint. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (3): 1168.
  16. Vuong W, Khan MB, Fischer C, Arutyunova E, Lamer T, Shields J, et al. Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. *Nat Commun*. 2020; 11: 4282.
  17. Schädel N, Icik E, Martini M, Altevogt L, Ramming I, Greulich A, et al. Synthesis of Imidazole and Histidine-Derived Cross-Linkers as Analogues of GOLD and Desmosine. *Synthesis (Stuttg)*. 2021; 53 (13): 2260–8.
  18. Mou K, Xu B, Ma C, Yang X, Zou X, Lü Y, et al. Novel CADD-based peptidyl vinyl ester derivatives as potential proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008; 18 (6): 2198–202.
  19. Prokhorova IV, Akulich KA, Makeeva DS, Osterman IA, Skvortsov DA, Sergiev PV, et al. Amicoumacin A induces cancer cell death by targeting the eukaryotic ribosome. *Sci Rep*. 2016; 6: 27720.
  20. Maksimova EM, Vinogradova DS, Osterman IA, Kasatsky PS, Nikonov OS, Milón P, et al. Multifaceted Mechanism of Amicoumacin A Inhibition of Bacterial Translation. *Front Microbiol*. 2021; 12: 618857.
  21. Terekhov SS, Nazarov AS, Mokrushina YA, Baranova MN, Potapova NA, Malakhova MV, et al. Deep functional profiling facilitates the evaluation of the antibacterial potential of the antibiotic amicoumacin. *Antibiotics*. 2020; 9: 157.
  22. Terekhov SS, Mokrushina YA, Nazarov AS, Zlobin A, Zalevsky A, Bourenkov G, et al. A kinase bioscavenger provides antibiotic resistance by extremely tight substrate binding. *Sci Adv*. 2020; 6 (26): eaaz9861.
  23. Therapeutics and COVID-19: living guideline, Geneva: World Health Organization c2022 [cited 2022 Dec 19]. Available from: <https://app.magicapp.org/#/guideline/nBkO1E/section/nYIjYl>.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФАВИПИРАВИРА И МОЛНУПИРАВИРА ПРОТИВ НОВЫХ ВАРИАНТОВ SARS-COV-2 В СИСТЕМАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*А. Э. Синявин<sup>1,2</sup>✉, Л. И. Руссу<sup>1</sup>, Д. В. Васина<sup>1</sup>, Е. В. Шидловская<sup>1</sup>, Н. А. Кузнецова<sup>1</sup>, В. А. Гушчин<sup>1,3</sup>, А. Л. Гинцбург<sup>1,4</sup><sup>1</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия<sup>2</sup> Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия<sup>4</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова

Пандемия заболевания COVID-19 остается важной глобальной проблемой общественного здравоохранения, которая приводит к сотням миллионов случаев заболевания и миллионам летальных исходов. По всему миру активно идут разработка и исследования специфических ингибиторов SARS-CoV-2 для лечения данной инфекции. Такие препараты, как фавипиравир и молнупиравир, проявляющие специфичную противовирусную активность против SARS-CoV-2, уже применяют для лечения пациентов. Однако имеются ограниченные данные об их эффективности, особенно против новых генетических вариантов возбудителя COVID-19. Целью исследования было изучить противовирусный эффект этих препаратов с использованием экспериментальной модели инфекции SARS-CoV-2 на культуре клеток Vero E6 *in vitro* и животной модели инфекции с использованием сирийских хомячков. Установлено, что молнупиравир оказывает выраженное ингибирующее действие против различных вариантов вируса SARS-CoV-2 со значениями IC<sub>50</sub> от 16,51 до 7,88  $\mu\text{M}$  *in vitro* и снижает инфекционный титр вируса в легких животных на  $\sim 1,5 \text{ Log}_{10}$  *in vivo*, в то время как фавипиравир проявляет более низкую активность и выраженную токсичность. Полученные результаты указывают на необходимость дальнейших исследований в направлении подбора дозировок и кратности применения.

**Ключевые слова:** COVID-19, SARS-CoV-2, противовирусная активность, фавипиравир, молнупиравир, Омикрон, противовирусные препараты

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке Минздрава России, грант № 12111200070-4 (П16).

**Благодарности:** авторы выражают благодарность сотрудникам НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи А. Захаровой и Т. Ремизову за организацию поставки реагентов для исследования.

**Вклад авторов:** А. Э. Синявин — планирование эксперимента, исследование противовирусной активности, анализ данных, написание текста; Л. И. Руссу — работа с вирусом и животными; Д. В. Васина — работа с животными; Е. В. Шидловская, Н. А. Кузнецова — ПЦР-анализ, обработка данных; В. А. Гушчин — руководство исследованием, редактирование текста; А.Л. Гинцбург — утверждение концепции исследования.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ (протокол № 27 от 6 июня 2022 г.); проведено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ Для корреспонденции: Андрей Эдуардович Синявин  
ул. Гамалеи, д. 16, г. Москва, 123098, Россия; andreysi93@yandex.ru

Статья получена: 05.12.2022 Статья принята к печати: 20.12.2022 Опубликована онлайн: 31.12.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.071

EFFICACY OF FAVIPIRAVIR AND MOLNUPIRAVIR AGAINST NOVEL SARS-COV-2 VARIANTS *IN VITRO* AND *IN VIVO*Siniavin AE<sup>1,2</sup>✉, Russu LI<sup>1</sup>, Vasina DV<sup>1</sup>, Shidlovskaya EV<sup>1</sup>, Kuznetsova NA<sup>1</sup>, Gushchin VA<sup>1,3</sup>, Gintsburg AL<sup>1,4</sup><sup>1</sup> Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia<sup>2</sup> Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia.<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia<sup>4</sup> Sechenov University, Moscow, Russia

The COVID-19 disease pandemic remains a significant global problem, resulting in hundreds of millions of cases and millions of deaths. The search for specific inhibitors of SARS-CoV-2 for the treatment of this infection remains relevant. Drugs such as Favipiravir and Molnupiravir, which exhibit specific antiviral activity against SARS-CoV-2, are already being used to treat patients. However, there is limited evidence of their effectiveness, especially against novel genetic variants of the COVID-19 pathogen. The aim of this study was to investigate the antiviral effect of these drugs using an *in vitro* experimental model of SARS-CoV-2 infection in Vero E6 cell culture and an animal model of infection using Syrian hamsters. It has been established that Molnupiravir has an inhibitory effect against variants of the SARS-CoV-2 with IC<sub>50</sub> values from 16.51 to 7.88  $\mu\text{M}$  *in vitro*, and reduces the infectious titer of the virus in the lungs of animals by  $\sim 1.5 \text{ Log}_{10}$  *in vivo*, in while Favipiravir shows lower activity and severe toxicity. Dose selection and frequency of use remain unexplored.

**Keywords:** COVID-19, SARS-CoV-2, antiviral activity, Favipiravir, Molnupiravir, Omicron, antivirals

**Funding:** the study was supported by the Russian Ministry of Health, grant № 12111200070-4 (P16).

**Acknowledgments:** the authors would like to thank the staff of N.I. N.F. Gamaleya A. Zakharova and T. Remizov for organizing the supply of reagents for the study.

**Author contribution:** Siniavin AE — design of the experiment, study of antiviral activity, data analysis, writing the text; Russu LI — work with the virus and animals; Vasina DV — work with animals; Shidlovskaya EV, Kuznetsova NA — PCR analysis, data processing; Gushchin VA — research supervision, text editing; Gintsburg AL — approval of the research concept.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the ethics committee of the Federal State Budgetary Institution "N.I. N.F. Gamaleya" of the Ministry of Health of the Russian Federation (protocol № 27 of June 6, 2022); conducted in compliance with the principles of the Declaration of Helsinki of the World Medical Association.

✉ Correspondence should be addressed: Andrey E. Siniavin  
Gamalei, 16, Moscow, 123098, Russia; andreysi93@yandex.ru

Received: 05.12.2022 Accepted: 20.12.2022 Published online: 31.12.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.071



Пандемия новой коронавирусной инфекции 2019 г. (COVID-19), вызванная коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), продолжает представлять собой угрозу для общественного здравоохранения во всем мире и увеличивает экономическое бремя. Распространение вируса среди людей все еще продолжается, и постоянно появляются новые варианты SARS-CoV-2, что приводит к острой потребности в препаратах для лечения этого заболевания, а также в расширенных исследованиях эффективности одобренных средств для лечения COVID-19.

Для лечения COVID-19 в РФ рекомендуют использовать несколько препаратов, обладающих специфическим противовирусным действием, среди которых фавипиравир и молнупиравир. Остается неизвестным, как изменилась эффективность данных препаратов по мере появления новых вариантов SARS-CoV-2.

Противовирусный препарат широкого спектра действия фавипиравир [1] нацелен на вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRP). Он эффективен как против сезонного вируса, так и против птичьего гриппа, а также SARS-CoV-2 в культуре клеток и *in vivo* в экспериментальных животных моделях. В организме человека фавипиравир фосфорилируется клеточными ферментами в его активную форму фавипиравир-рибофуранозил-5'-трифосфат (F-RTP). F-RTP не сильно влияет на клеточную транскрипцию. Существует несколько гипотез относительно того, как F-RTP взаимодействует с RdRp. Некоторые исследования показали, что при встраивании F-RTP в образующуюся цепь РНК он предотвращает удлинение цепи РНК и размножение вируса. Показано также, что присутствие аналогов пурина может снижать противовирусную активность фавипиравира, т. е. возможна конкуренция между F-RTP и пуриновыми нуклеотидами за связывание с RdRp. По результатам клинических исследований, фавипиравир не улучшает время излечения или клинические исходы и не демонстрирует противовирусного эффекта при лечении инфекции COVID-19 [2–4].

$\beta$ -D-N4-гидроксицитидин (NHC, EIDD-1931) представляет собой аналог рибонуклеозида, обладающий широким спектром активности против различных РНК-содержащих вирусов [5]. Молнупиравир (MK-4482/EIDD-2801), или  $\beta$ -D-N4-гидроксицитидин-5'-изопропиловый эфир, является биологически активным пролекарством NHC. Он является пероральным препаратом и более удобен для массового применения среди людей, чем ремдесивир или другие противовирусные агенты, такие как реконвалесцентная плазма и нейтрализующие антитела, которые требуют внутривенных или внутримышечных инъекций и использования в стационаре. Было показано, что NHC эффективен против различных РНК-вирусов, таких как грипп, вирус Эбола (EBOV), вирус веноульсального энцефалита (VEEV), SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV и родственных зоонозных групп 2b или 2c Bat-CoV в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [6–8]. Серия доклинических и клинических испытаний доказала, что молнупиравир безопасен и эффективен для лечения инфекции SARS-CoV-2 [9, 10]. После перорального приема молнупиравир быстро превращается в активный NHC в плазме, распределяется в различных органах и превращается в соответствующий 5'-трифосфат с помощью киназ организма человека [11]. Известно, что 5'-трифосфат NHC является конкурентным субстратом для вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы, интегрируется в вирусную

РНК и приводит к накоплению летальных мутаций в вирусном геноме [12].

С 2022 г. во всем мире доминирует новый вариант SARS-CoV-2 B.1.1.529 («Омикрон») и его дочерние подварианты, содержащие множественные мутации в вирусном геноме [13]. Мутации в RBD-домене S-гликопротеина снижают эффективность предсуществующих антител, полученных при естественно перенесенном COVID-19 и вакцинации [14]. С учетом появления новых вариантов SARS-CoV-2 целью данной работы было оценить эффективность фавипиравира и молнупиравира против различных вариантов SARS-CoV-2.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на клеточной линии Vero E6 (ATCC CRL-1586). Клетки культивировали в ростовой среде DMEM (Gibco; США), дополненной 5%-й эмбриональной бычьей сывороткой (FBS; HyClone, США), 1× раствор антибиотика-антимикотика (Capricorn Scientific GmbH; Germany) и 1× GlutaMAX (Gibco; США). Для исследования антивирусного эффекта к монослою клеток добавляли различные разведения исследуемого соединения и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. После этого производили заражение вирусом SARS-CoV-2 при 100 TCID<sub>50</sub> (TCID<sub>50</sub> — тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя). В данном эксперименте использовали следующие варианты вируса SARS-CoV-2: «Ухань» B.1.1 (PMVL-4), «Омикрон» BA.4.6 (PMVL-55), «Омикрон» BA.5 (PMVL-52) и «Омикрон» BA.5.2 (PMVL-54). Ингибирование вирус-индуцированного цитопатического эффекта (CPE) под действием соединения определяли с помощью МТТ-теста [15].

Для животной модели инфекции использовали самок сирийских хомячков (питомник «Столбовая»; Россия). Животных содержали в индивидуально-вентилируемых клетках (температура 21–25 °C, влажность 20%, давление –0,1 кПа), со свободным доступом к еде и воде. Световой режим составлял 12 ч света и 12 ч темноты. Животные были разделены на экспериментальные группы (по 5–8 особей), которым перорально вводили молнупиравир (200 мг/кг), фавипиравир (200–300 мг/кг), и контрольную группу инфицированных животных. Производили интраназальное заражение животных при 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> SARS-CoV-2 штаммом PMVL-4 или PMVL-52. В течение четырех дней животным вводили исследуемые препараты два раза в день. На пятый день эксперимента животных подвергали эвтаназии ингаляцией CO<sub>2</sub> и цервикальной дислокации, производили их вскрытие и забор легких. Легкие хомячков подвергали гомогенизации с последующим отделением супернатанта низкоскоростным центрифугированием при 12 000 об./мин в течение 10 мин. Титр вируса определяли в монослое клеток Vero E6. Для каждого образца гомогената легких титр вируса определяли спустя 72 ч, и выражали в виде БОЕ/мг легкого (бляшкообразующие единицы). Тотальную РНК из гомогенатов легких выделяли с помощью реагента ExtractRNA («Евроген»; Россия) согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции выполняли с помощью набора реагентов для количественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2 FRT» с использованием панели охарактеризованных по количеству копий амплифицируемого фрагмента SARS-CoV-2 (НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи; Россия). Результаты выражали в виде чисел, преобразованных в log<sub>10</sub> вирусной нагрузки SARS-CoV-2 на 1 мг ткани легкого.

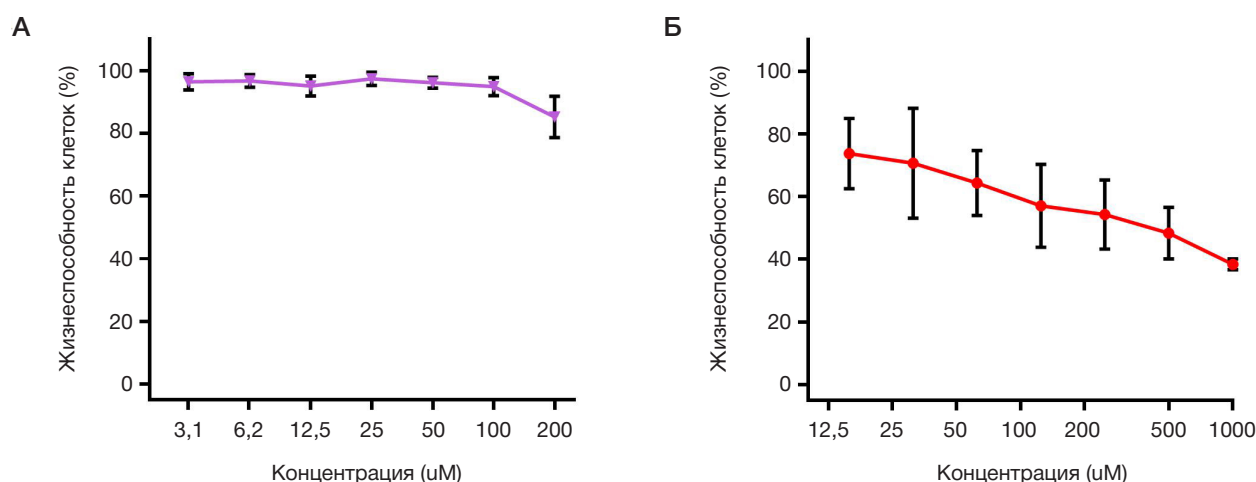


Рис. 1. Исследование цитотоксичности молнупиравира (А) и фавипиравира (Б) с использованием клеток Vero E6

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе исследований проведена оценка цитотоксичности фавипиравира и молнупиравира в отношении клеток Vero E6. Было выяснено, что фавипиравир обладает выраженным цитотоксическим эффектом, в значительной степени ингибируя пролиферацию клеток в концентрации 1000 µM (снижение жизнеспособности клеток до 60%). При всех остальных протестированных концентрациях фавипиравир дозозависимо проявлял цитотоксический эффект (рис. 1). Молнупиравир не оказывал заметного влияния на жизнеспособность клеток, ингибируя их пролиферацию при 200 µM в среднем на 10%.

Исследование антивирусной активности препаратов фавипиравир и молнупиравир в отношении SARS-CoV-2 проводили с использованием четырех вариантов вируса: референс-штамм варианта «Ухань» (генетическая линия B.1.1) и трех вариантов вируса «Омикрон», циркулирующих в данный момент как в РФ, так и во всем мире (BA.4.6, BA.5 и BA.5.2) (рис. 2). Установлено, что в концентрации 1000 µM фавипиравир не проявлял активности против референс-штамма из линии B.1.1. Ингибирование ~50% при той же концентрации (~160 мг/мл) выявлено для вариантов вируса «Омикрон» BA.5 и BA.5.2. Ингибирование варианта вируса «Омикрон» BA.4.6 не превышало 20%. Молнупиравир показал широкий спектр антивирусной активности, ингибируя все используемые варианты вируса со значениями  $IC_{50}$  от 16.51 до 7.88 µM.

Далее эффективность препаратов была исследована с использованием инфекционной животной модели. Сирийским хомякам перорально через зонд вводили

300 мг/кг фавипиравира или 200 мг/кг молнупиравира. Затем животных подвергали интраназальному заражению вирусом SARS-CoV-2 вариант «Ухань». Препараты давали животным два раза в день, в течение четырех дней. В ходе инфекции животные из контрольной инфицированной группы потеряли вес более чем на 20% ( $p < 0,01$ ). Животные, получавшие фавипиравир, потеряли вес на 10% ( $p > 0,05$ ), проявляли апатию и отказ от корма, что указывает на токсический эффект препарата. Животные, получавшие молнупиравир, набрали вес в ходе эксперимента (рис. 3). Исследование вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в легких животных показало, что как молнупиравир, так и фавипиравир снижают количество РНК ( $1 \text{ Log}_{10}$ ). При определении инфекционного титра SARS-CoV-2 в легких животных было установлено, что все препараты подавляют репликацию вируса. Лечение животных с помощью молнупиравира и фавипиравира в значительной степени снижало титр вируса ( $\sim 1,5 \text{ Log}_{10}$ ). При исследовании эффективности препаратов на животных с использованием варианта вируса «Омикрон» BA.5 было обнаружено, что данный вариант менее патогенен, по сравнению с вариантом вируса «Ухань». Испытуемым особям вводили одинаковые дозы препаратов (200 мг/кг). В ходе эксперимента животные набрали вес во всех исследуемых группах. Выявлено снижение вирусной нагрузки в легких на  $1,5 \text{ Log}_{10}$  для группы животных, получавших молнупиравир (EIDD-2801), однако данные статистически недостоверны ( $p > 0,05$ ). При этом молнупиравир достоверно подавлял репликацию вируса в легких, что отображалось снижением БОЕ ( $\sim 1,5 \text{ Log}_{10}$ ;  $p < 0,05$ ). Для фавипиравира снижение вирусной нагрузки ( $0,5 \text{ Log}_{10}$ ) и титра жизнеспособного

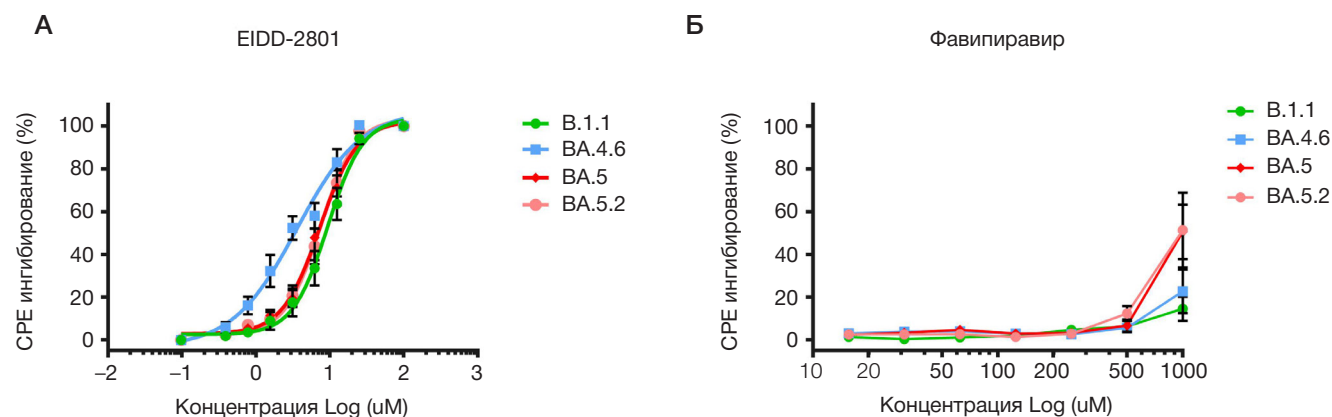


Рис. 2. Антивирусная активность молнупиравира (EIDD-2801) (А) и фавипиравира (Б) против четырех различных вариантов вируса SARS-CoV-2

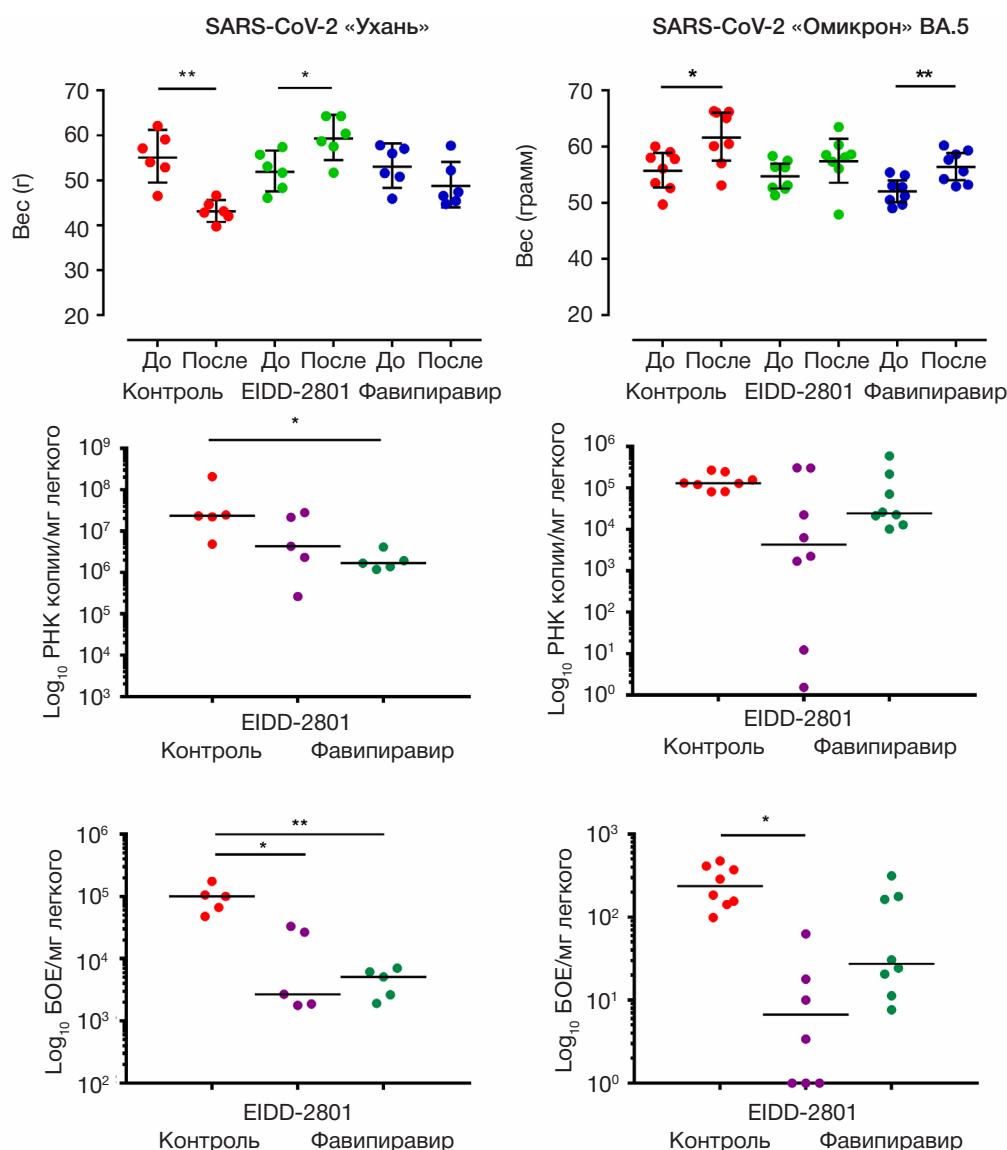
вируса ( $1 \text{ Log}_{10}$ ) было менее выраженным и оказалось статистически недостоверным ( $p > 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Преыдушие исследования антивирусной активности фавипиавира против SARS-CoV-2 показывают, что он обладает невысоким противовирусным эффектом со значениями  $\text{EC}_{50} > 200 \text{ } \mu\text{M}$ . Высокие дозы фавипиавира были связаны с признаками токсичности у животных при исследовании эффективности препарата [16], поскольку *in vivo* фавипиавир проявляет антивирусный эффект при двукратной дозировке в  $300 \text{ мг/кг}$ , со снижением инфекционного титра вируса в легких на  $\sim 1,5 \text{ Log}_{10}$  [17]. В других работах показано, что фавипиавир проявляет активность со значением  $\text{EC}_{50} \sim 62 \text{ } \mu\text{M}$  [18]. Полученные в ходе нашего исследования результаты тоже указывают на ограниченный противовирусный потенциал фавипиавира. При инфицировании клеток Vero E6 вирусом SARS-CoV-2 установлено, что данный препарат не обладает антивирусной активностью *in vitro*, а также проявляет цитотоксичность. Нами показана эффективность данного

препарата в дозе  $300 \text{ мг/кг}$  два раза в день на животной модели инфекции с применением варианта вируса «Ухань». На животной модели с применением варианта вируса «Омикрон» при использовании сниженной до  $200 \text{ мг/кг}$  дозировки эффект оказался недостоверным. Однако изменения в поведении животных и снижение их веса при лечении фавипиавиром в дозе  $300 \text{ мг/кг}$  указывают на его токсический эффект и необходимость дальнейшего подбора дозы, чтобы сочетать отсутствие токсичности и сохранение активности препарата.

Исследования с использованием первичных клеток человека и других клеточных линий подтвердили, что NHC (активный метаболит молнупиравира) обладает мощной противовирусной активностью против различных коронавирусов, таких как SARS-CoV, SARS-CoV-2 и MERS-CoV. Значения  $\text{IC}_{50}$  для молнупиравира против SARS-CoV-2 составляли  $0,3\text{--}0,08 \text{ } \mu\text{M}$  [19]. Нами установлено, что молнупиравир проявляет противовирусную активность для всех исследованных вариантов вируса SARS-CoV-2, с проявлением низкой цитотоксичности. Молнупиравир проявлял противовирусную активность на животных, инфицированных вирусом как варианта «Ухань», так и



**Рис. 3.** Исследование эффективности препаратов против варианта вируса «Ухань» и «Омикрон» BA.5 с использованием животной модели инфекции. Представлены графики изменения веса животных, а также значения вирусной нагрузки и титра вируса в легких для каждого животного в соответствующей группе. ANOVA with Tukey's post hoc test: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$

«Омикрон» ВА.5. В недавно проведенном исследовании молниупиравир тоже ингибировал репликацию вируса в легких хомяков, инфицированных вариантом вируса «Омикрон» [20]. Молниупиравир значительно ингибировал репликацию вируса в верхних и нижних дыхательных путях хомяков. При этом исследователи установили, что «Омикрон» менее патогенен для животных, по сравнению с более ранними генетическими линиями SARS-CoV-2 [21].

## ВЫВОДЫ

Препарат фавипиравир проявлял достаточно низкий антивирусный эффект против SARS-CoV-2 в максимальной протестированной концентрации, которая обладала наиболее выраженным цитотоксическим эффектом. В связи с выраженным цитотоксическим потенциалом и слабой антивирусной активностью *in vitro* и *in vivo* требуется

проведение дополнительных исследований безопасности и эффективности фавипиравира, проведение подбора дозировок, кратности применения, а также уточнение показаний к применению, чтобы сочетать эффективность с минимальной токсичностью для организма человека. В случае молниупиравира мы наблюдали более выраженную эффективность и безопасность с использованием моделей *in vitro* и *in vivo*. Результаты в отношении активности против варианта «Омикрон» расширяют ранее полученные данные для обоих препаратов. Требуются дальнейшие усилия в поиске новых ингибиторов и их композиций, обладающих более высокой специфичной противовирусной активностью. Необходимы дальнейшие исследования допущенных к применению средств фавипиравир и молниупиравир с целью подбора оптимальных схем лечения для достижения максимального противовирусного эффекта.

## Литература

1. Yousuke F, Takashi K, Takaaki N. Favipiravir (T-705), a broad-spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2017; 93 (7): 449–63.
2. McMahon JH, Lau JS, Coldham A, et al. Favipiravir in early symptomatic COVID-19, a randomised placebo-controlled trial. *EClinicalMedicine.* 2022; 20 (54): 101703.
3. Yanagisawa K, Takara K, Suga H, et al. The Assessment of the Efficacy and Safety of Favipiravir for Patients with SARS-CoV-2 Infection: A Multicenter Non-randomized, Uncontrolled Single-arm Prospective Study. *Intern Med.* 2022; 61 (21): 3197–204.
4. Bosaeed M, Alharbi A, Mahmoud E, et al. Efficacy of favipiravir in adults with mild COVID-19: a randomized, double-blind, multicentre, placebo-controlled clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2022; 28 (4): 602–8.
5. Lee CC, Hsieh CC, Ko WC. Molnupiravir-A Novel Oral Anti-SARS-CoV-2 Agent. *Antibiotics (Basel).* 2021; 10 (11): 1294.
6. Toots M, Yoon JJ, Hart M, Natchus MG, Painter GR, Plemper RK. Quantitative efficacy paradigms of the influenza clinical drug candidate EIDD-2801 in the ferret model. *Transl Res.* 2020; 218: 16–28.
7. Yoon JJ, Toots M, Lee S, et al. Orally Efficacious Broad-Spectrum Ribonucleoside Analog Inhibitor of Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62 (8): e00766–18.
8. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, et al. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med.* 2020; 12 (541): eabb5883.
9. Wahl A, Gralinski LE, Johnson CE, et al. SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801. *Nature.* 2021; 591 (7850): 451–7.
10. Painter WP, Holman W, Bush JA, Almazedi F, Malik H, Eraut NC, Morin MJ, Szewczyk LJ, Painter GR. Human Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Molnupiravir, a Novel Broad-Spectrum Oral Antiviral Agent with Activity Against SARS-CoV-2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022; 66 (5): e02428–20.
11. Imran M, Arora MK, Asdaq SM, et al. Discovery, Development, and Patent Trends on Molnupiravir: A Prospective Oral Treatment for COVID-19. *Molecules.* 2021; 26 (19): 5795.
12. Kabinger A, Stiller C, Schmitzová J, Dienemann C, Kokic G, Hillen HS, Höbartner C, Cramer P. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2021; 28 (9): 740–746.
13. Mohapatra RK, Kupilli S, Suvvari TK, et al. SARS-CoV-2 and its variants of concern including Omicron: A never ending pandemic. *Chem Biol Drug Des.* 2022; 99 (5): 769–88.
14. Gushchin VA, Pochtovyi AA, Kustova DD, et al. Dynamics of SARS-CoV-2 Major Genetic Lineages in Moscow in the Context of Vaccine Prophylaxis. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (23): 14670.
15. Siniavin AE, Streltsova MA, Nikiforova MA, et al. Snake venom phospholipase A2s exhibit strong virucidal activity against SARS-CoV-2 and inhibit the viral spike glycoprotein interaction with ACE2. *Cell Mol Life Sci.* 2021; 78 (23): 7777–94.
16. Driouch JS, Cochin M, Lingas G, et al. Favipiravir antiviral efficacy against SARS-CoV-2 in a hamster model. *Nat Commun.* 2021; 12 (1): 1735.
17. Abdelnabi R, Foo CS, Kaptein SJ, et al. The combined treatment of Molnupiravir and Favipiravir results in a potentiation of antiviral efficacy in a SARS-CoV-2 hamster infection model. *EBioMedicine.* 2021; 72: 103595.
18. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, Shi Z, Hu Z, Zhong W, Xiao G. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* 2020; 30 (3): 269–71.
19. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, et al. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med.* 2020; 12 (541): eabb5883.
20. Rosenke K, Okumura A, Lewis MC, Feldmann F, Meade-White K, Bohler WF, Griffin A, Rosenke R, Shaia C, A Jarvis MA, Feldmann H. Molnupiravir inhibits SARS-CoV-2 variants including Omicron in the hamster model. *JCI Insight.* 2022; 7 (13): e160108.
21. Yuan S, Ye ZW, Liang R, et al. Pathogenicity, transmissibility, and fitness of SARS-CoV-2 Omicron in Syrian hamsters. *Science.* 2022; 377 (6604): 428–33.
1. Yousuke F, Takashi K, Takaaki N. Favipiravir (T-705), a broad-spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2017; 93 (7): 449–63.
2. McMahon JH, Lau JS, Coldham A, et al. Favipiravir in early symptomatic COVID-19, a randomised placebo-controlled trial. *EClinicalMedicine.* 2022; 20 (54): 101703.
3. Yanagisawa K, Takara K, Suga H, et al. The Assessment of the Efficacy and Safety of Favipiravir for Patients with SARS-CoV-2 Infection: A Multicenter Non-randomized, Uncontrolled Single-arm Prospective Study. *Intern Med.* 2022; 61 (21): 3197–204.
4. Bosaeed M, Alharbi A, Mahmoud E, et al. Efficacy of favipiravir in adults with mild COVID-19: a randomized, double-blind, multicentre, placebo-controlled clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2022; 28 (4): 602–8.



5. Lee CC, Hsieh CC, Ko WC. Molnupiravir-A Novel Oral Anti-SARS-CoV-2 Agent. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10 (11): 1294.
6. Toots M, Yoon JJ, Hart M, Natchus MG, Painter GR, Plemper RK. Quantitative efficacy paradigms of the influenza clinical drug candidate EIDD-2801 in the ferret model. *Transl Res*. 2020; 218: 16–28.
7. Yoon JJ, Toots M, Lee S, et al. Orally Efficacious Broad-Spectrum Ribonucleoside Analog Inhibitor of Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62 (8): e00766–18.
8. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, et al. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med*. 2020; 12 (541): eabb5883.
9. Wahl A, Gralinski LE, Johnson CE, et al. SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801. *Nature*. 2021; 591 (7850): 451–7.
10. Painter WP, Holman W, Bush JA, Almazedi F, Malik H, Eraut NC, Morin MJ, Szewczyk LJ, Painter GR. Human Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Molnupiravir, a Novel Broad-Spectrum Oral Antiviral Agent with Activity Against SARS-CoV-2. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021; 65 (5): e02428–20.
11. Imran M, Arora MK, Asdaq SM, et al. Discovery, Development, and Patent Trends on Molnupiravir: A Prospective Oral Treatment for COVID-19. *Molecules*. 2021; 26 (19): 5795.
12. Kabinger A, Stiller C, Schmitzová J, Dienemann C, Kokic G, Hillen HS, Höbartner C, Cramer P. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis. *Nat Struct Mol Biol*. 2021; 28 (9): 740–746.
13. Mohapatra RK, Kuppli S, Suvvari TK, et al. SARS-CoV-2 and its variants of concern including Omicron: A never ending pandemic. *Chem Biol Drug Des*. 2022; 99 (5): 769–88.
14. Gushchin VA, Pochtovyi AA, Kustova DD, et al. Dynamics of SARS-CoV-2 Major Genetic Lineages in Moscow in the Context of Vaccine Prophylaxis. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (23): 14670.
15. Siniavin AE, Streltsova MA, Nikiforova MA, et al. Snake venom phospholipase A2s exhibit strong virucidal activity against SARS-CoV-2 and inhibit the viral spike glycoprotein interaction with ACE2. *Cell Mol Life Sci*. 2021; 78 (23): 7777–94.
16. Driouich JS, Cochin M, Lingas G, et al. Favipiravir antiviral efficacy against SARS-CoV-2 in a hamster model. *Nat Commun*. 2021; 12 (1): 1735.
17. Abdelnabi R, Foo CS, Kaptein SJ, et al. The combined treatment of Molnupiravir and Favipiravir results in a potentiation of antiviral efficacy in a SARS-CoV-2 hamster infection model. *EBioMedicine*. 2021; 72: 103595.
18. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, Shi Z, Hu Z, Zhong W, Xiao G. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res*. 2020; 30 (3): 269–71.
19. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, et al. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med*. 2020; 12 (541): eabb5883.
20. Rosenke K, Okumura A, Lewis MC, Feldmann F, Meade-White K, Bohler WF, Griffin A, Rosenke R, Shaia C, A Jarvis MA, Feldmann H. Molnupiravir inhibits SARS-CoV-2 variants including Omicron in the hamster model. *JCI Insight*. 2022; 7 (13): e160108.
21. Yuan S, Ye ZW, Liang R, et al. Pathogenicity, transmissibility, and fitness of SARS-CoV-2 Omicron in Syrian hamsters. *Science*. 2022; 377 (6604): 428–33.

## ПРЯМОЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ МЕНИНГИОМ: ИНТРАОПЕРАЦИОННЫЙ МОНИТОРИНГ НА ОСНОВЕ ОНКОМЕТАБОЛИТОВ

Д. С. Бормотов<sup>1</sup>, М. А. Шамраева<sup>1</sup>, А. А. Кузин<sup>1</sup>, Е. В. Шамарина<sup>1</sup>, В. А. Елиферов<sup>1</sup>, С. В. Силкин<sup>1</sup>, Е. В. Жданова<sup>1</sup>, С. И. Пеков<sup>2,3</sup>✉, И. А. Попов<sup>1</sup><sup>1</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия<sup>2</sup> Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия<sup>3</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

Основным методом лечения менингиом на первом этапе является нейрохирургическое вмешательство с максимальной радикальностью. Для повышения полноты резекции в настоящее время разрабатывают различные подходы интраоперационной диагностики, в частности, опирающиеся на принципы молекулярного профилирования. Основанные на масс-спектрометрии с прямой ионизацией, подобные методы демонстрируют свою эффективность на различных видах опухолей, однако особенности молекулярного строения и механические характеристики менингиом не позволяют напрямую транслировать протоколы, разработанные для других нозологий. Целью работы было провести сравнение возможностей применения трех методов прямой ионизации для исследования образцов менингиом: метода прямого спрея с ткани, метода картриджной экстракции и метода ионизации с поверхности сферического пробоотборника. Для этого анализировали липидный и метаболический профиль тканей менингиом, иссеченных в ходе планового нейрохирургического вмешательства. Было показано, что для анализа липидных компонент молекулярного профиля оптимальным для клинического применения оказывается метод картриджной экстракции, отличающийся наиболее простой реализацией и максимальной информативностью. Для анализа онкометаболитов с малой молекулярной массой лучшим выбором является метод ионизации с поверхности сферического пробоотборника, обеспечивающий высокую чувствительность и наилучшую производительность масс-спектрометрического комплекса.

**Ключевые слова:** масс-спектрометрия, прямая ионизация, электрораспылительная ионизация, менингиома, липиды, онкометаболиты

**Финансирование:** работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-00337-20-02, проект № 0714-2020-0006), с использованием оборудования ЦКП ФИЦ ХФ им. Н. Н. Семенова РАН.

**Вклад авторов:** Д. С. Бормотов — проведение эксперимента, анализ данных, редактирование статьи; М. А. Шамраева — анализ данных, подготовка иллюстраций, написание статьи; А. А. Кузин — проведение эксперимента; Е. В. Шамарина — проведение эксперимента, разработка ионных источников; В. А. Елиферов — разработка ионных источников; С. В. Силкин — проведение экспериментов, анализ данных; Е. В. Жданова — анализ данных; С. И. Пеков — концепция, написание статьи; И. А. Попов — поиск источников финансирования, руководство, редактирование статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом НМИЦН имени Н. Н. Бурденко (протоколы № 40 от 12 апреля 2016 г. и № 131 от 17 июля 2018 г.), проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (2000 г.) и ее последующих пересмотров. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и использование биоматериалов в исследовательских целях.

✉ Для корреспонденции: Станислав Игоревич Пеков  
Большой бульвар, д. 30, стр. 1, Москва, 121205, Россия; stanislav.pekov@forwe.ru

Статья получена: 27.11.2022 Статья принята к печати: 14.12.2022 Опубликована онлайн: 30.12.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.072

## AMBIENT MS PROFILING OF MENINGIOMAS: INTRAOPERATIVE ONCOMETABOLITE-BASED MONITORING

Bormotov DS<sup>1</sup>, Shamraeva MA<sup>1</sup>, Kuzin AA<sup>1</sup>, Shamarina EV<sup>1</sup>, Elifirov VA<sup>1</sup>, Silkin SV<sup>1</sup>, Zhdanova EV<sup>1</sup>, Pekov SI<sup>2,3</sup>✉, Popov IA<sup>1</sup><sup>1</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia<sup>2</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia<sup>3</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

The primary method of initial treatment of meningiomas is radical neurosurgical intervention. Various methods of intraoperative diagnostics currently in development aim to improve resection efficiency; we focus on methods based on molecular profiling using ambient ionization mass spectrometry. Such methods have been proven effective on various tumors, but the specifics of the molecular structure and the mechanical properties of meningiomas raise the question of applicability of protocols developed for other conditions for this particular task. The study aimed to compare the potential clinical use of three methods of ambient ionization in meningioma sample analysis: spray from tissue, inline cartridge extraction, and touch spherical sampler probe spray. To this end, lipid and metabolic profiles of meningioma tissues removed in the course of planned neurosurgical intervention have been analyzed. It is shown that in clinical practice, the lipid components of the molecular profile are best analyzed using the inline cartridge extraction method, distinguished by its ease of implementation and highest informational value. Analysis of oncometabolites with low molecular mass is optimally performed with the touch spherical sampler probe spray method, which scores high in both sensitivity and mass-spectrometric complex productivity.

**Keywords:** mass spectrometry, ambient ionization, electrospray ionization, meningioma, lipids, oncometabolites

**Funding:** The study was conducted as part of the state task of the Ministry of Science and Higher Education (agreement №075-00337-20-02, project № 0714-2020-0006), using the equipment of the N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences.

**Author contribution:** Bormotov DS — experiment, data analysis, manuscript editing; Shamraeva MA — data analysis, preparation of illustrations, manuscript writing; Kuzin AA — experiment; Shamarina EV — experiment, ion source development; Elifirov VA — ion source development; Silkin SV — experiments, data analysis; Zhdanova EV — data analysis; Pekov SI — study concept, manuscript writing; Popov IA — search for sources of funding, project management, manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of N. N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery (protocols №40 of 12 April 2016 and №131 of 17 July 2018) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (2000 and subsequent revisions). All patients signed a voluntary informed consent form to participate in the study with use of biomaterials for research purposes.

✉ Correspondence should be addressed: Stanislav I. Pekov  
Bolshoy Blvd., 30, str. 1, 121205, Moscow, Russia; stanislav.pekov@forwe.ru

Received: 27.11.2022 Accepted: 14.12.2022 Published online: 30.12.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.072

Среди разнообразных оболочечных опухолей центральной нервной системы (ЦНС) менингиомы наиболее клинически значимы. Эти часто встречающиеся у взрослых образования головного мозга составляют более 36% от общего числа новодиагностированных опухолей ЦНС [1, 2]. В подавляющем большинстве случаев их обнаруживают случайно, т. е. на начальном этапе заболевание развивается бессимптомно, однако в 15% случаев можно наблюдать клиническую симптоматику. С увеличением возраста отмечается увеличение частоты встречаемости менингиом, при этом достоверно чаще они встречаются у женщин репродуктивного возраста; соотношение женщин и мужчин в этой группе составляет 2 : 1 [3]. Предполагается, что это может быть обусловлено особенностями гормонального профиля женщин. Клиническая симптоматика при менингиомах отличается значительной вариабельностью и зависит от локализации опухоли. Как и при других интракраниальных опухолях, при менингиомах могут иметь место проявления внутричерепной гипертензии в виде головной боли, тошноты, рвоты, снижения остроты зрения [4].

Первым этапом лечения симптоматических менингиом является их микрохирургическое или эндоскопическое удаление с максимально возможной радикальностью [5, 6]. В последнее время разработано множество методов, используемых для визуализации опухолей головного мозга, однако в большинстве случаев в клинической практике определение границ опухоли не производят в режиме реального времени. В настоящее время методы магнитно-резонансной томографии, преимущественно используемые на предоперационном этапе, имеют как диагностическое, так и оперативно-навигационное применение. Другие клинически значимые методы включают флуоресцентный молекулярный имиджинг [7] (его применение ограничено в основном специфичностью и чувствительностью проводимого исследования) и интраоперационное ультразвуковое исследование (неприменимо, если плотность опухоли близка к плотности интактной ткани). Гистопатологические методы являются золотым стандартом при исследовании опухолей и позволяют получить диагностическую информацию во время операции в течение получаса, но обычно они ограничены оценкой одного или небольшого количества сегрегированных образцов от каждой операции и не используются для оценки границы краев опухоли.

Для увеличения эффективности хирургического вмешательства идет разработка различных технологий интраоперационной диагностики [8, 9], позволяющих контролировать состав удаляемой ткани, и основанных в том числе на молекулярном профилировании иссекаемых тканей [10–13]. Например, ганглиозиды используют для дифференциации астроцитомы [14]. Липидные профили, онкометаболиты и специфичные нейрометаболиты, такие как *n*-ацетиласпартат (NAA), тоже используют для определения границ опухоли [15, 16].

Методы прямой масс-спектрометрии позволяют анализировать иссекаемые ткани практически в режиме реального времени. Регистрируемые молекулярные профили содержат информацию как о метаболическом профиле тканей, так и об изменении соотношения различных липидов, что позволяет построить автоматические классификаторы, определяющие присутствие и долю злокачественных клеток в исследуемом образце [17, 18]. Так, при помощи методов, основанных на экспресс-экстракции липидов и метаболитов из ткани [13, 17, 19]

либо на ионизации после касания (*touch spray ionization*) [15, 20, 21], были разработаны методы дифференциации различных опухолей от интактной ткани. Однако специфика молекулярного строения оболочечных опухолей ЦНС ставит задачу выбора метода прямой ионизации, оптимального для дальнейшего развития методов интраоперационной диагностики менингиом. Целью данной работы было провести сравнение трех методов масс-спектрометрического профилирования и определить их применимость для решения задач дифференциации опухолевой и интактной ткани у пациентов с менингиомой.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гистологически аннотированные и анонимизированные образцы менингиом были предоставлены НМИЦН им. Н. Н. Бурденко. Все образцы получены в рамках плановых операций по резекции патологической ткани головного мозга.

Три метода молекулярного профилирования были применены к образцам оболочечных опухолей головного мозга человека: метод прямого спрея с ткани (*spray from tissue, SFT*) [22, 23], метод картриджной экстракции (*inline cartridge extraction, ICE*) [17], ионизация с поверхности сферического волоконистого пробоотборника, или прямая экстракционная ионизация (*touch spherical sampler probe spray, SSP*) [21].

Для анализа образцов менингиом с помощью метода прямого спрея с ткани [22, 23] образец размером около 2 мм<sup>2</sup> помещали на острие одноразовой инъекционной иглы, расположенной на расстоянии 10 мм от входного интерфейса в вакуумную систему масс-спектрометра. Для подачи растворителя к образцу использовали капилляр из кварцевого стекла (*fused silica*) (рис. 1).

Для экстракции липидов и метаболитов растворитель подают по капилляру непосредственно на поверхность образца, в результате чего молекулы экстрагируются из образца. Для ионизации молекул к инъекционной игле прикладывают высокое напряжение, до 4–6 кВ (подбирают эмпирически исходя из геометрических параметров образца), что обеспечивает формирование конуса Тейлора и электрораспыление на конце иглы, непосредственно после экстракции молекул. Скорость потока растворителя для экстракции составляет 3 мкл/мин.

Для реализации метода картриджной экстракции [17] в линию для подачи растворителя посредством стандартных соединений для подачи растворов вставляют одноразовый картридж с образцом (рис. 2).

Картридж представляет собой трубку из нержавеющей стали, внутренний диаметр которой составляет 1,8 мм. В картридж помещают образец объемом приблизительно 1 мм<sup>2</sup>, молекулы из которого экстрагируются растворителем, протекающим через линию подачи растворителя. Для соединения с линией в трубку вставляют два коротких участка капилляра PEEK (*polyether ether ketone*) и обжимают для предотвращения утечек. Фильтр из стекловолна в картридже предотвращает попадание макроскопических частей образца в линию и ее перекрывания. После картриджа на конце линии установлен стандартный коммерчески доступный ионный источник электрораспыления. Напряжение на ионном источнике составляет 3 кВ в режиме регистрации положительно-заряженных ионов и 4 кВ в режиме регистрации отрицательно-заряженных ионов. Скорость потока растворителя для экстракции составляет 2 мкл/мин.

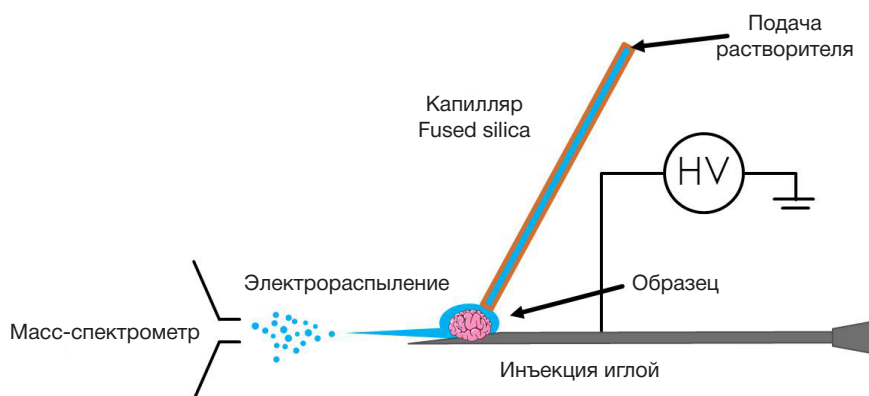


Рис. 1. Схема установки для прямого спрея с ткани

В методе ионизации с поверхности сферического волокнистого пробоотборника [21] используют объемные пробоотборники с последующей ионизацией электрораспылением непосредственно с их поверхности. Пробоотборники представляют собой стержень из очищенных и прессованных полимерных волокон (полиэтилентерефталат) длиной 10 мм, диаметром 2 мм. Процедура отбора включает в себя забор образца с помощью пористого объемного пробоотборника посредством мазка. В дальнейшем пробоотборник закрепляют в специальном ионном источнике, в котором обеспечивается подведение растворителя (80 мкл) и высокого напряжения (5 кВ) для осуществления электрораспыления.

Для сравнения эффективности применения различных методов прямой ионизации проводили анализ трех образцов менингиомы, полученных от трех пациентов. Каждый образец менингиомы разделяли на три части и анализировали каждым из предложенных методов. Результаты исследования валидировали на образцах менингиом, полученных от трех различных пациентов. Эксперименты проводили с использованием гибридного масс-спектрометра LTQ XL Orbitrap ETD (ThermoFisher; США) в режиме полного сканирования с  $m/z$  100–2000. Масс-спектры были получены с использованием масс-анализаторов как низкого разрешения (ионной ловушки LTQ XL в режиме сканирования «normal»), так и высокого разрешения (Orbitrap с разрешением 30 000 FWHM при  $m/z = 400$ ). Температура нагревательного капилляра

на входе в масс-спектрометр составляла 220 °С. Для приготовления рабочего раствора для экстракции использовали метанол (MeOH, > 99,9% ВЭЖХ; Merck KGaA; Германия), изопропанол (i-PrOH, > 99,9% ВЭЖХ; Merck KGaA, Германия), ацетонитрил (ACN, > 99,9% ВЭЖХ; Merck KGaA, Германия), уксусную кислоту (CH<sub>3</sub>COOH, > 99%; Merck KGaA, Германия) и деионизированную воду, чистоту которой контролировали по значению удельного сопротивления, составлявшего не менее 17 МОм·см. Для экстракции использовали растворитель, состоящий из MeOH, i-PrOH, ACN и H<sub>2</sub>O в отношении 3 : 3 : 3 : 1 (об.), с добавлением 0,1% (об.) CH<sub>3</sub>COOH, оптимально экстрагирующий молекулы липидов и метаболитов из мягких тканей и подходящий для применения в источниках ионизации электрораспылением.

Наиболее интенсивные пики идентифицировали по их точной массе с помощью ПО LipiDex [24], и по их изотопному распределению с помощью ПО Xcalibur™ (Thermo Scientific-Xoce; США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При регистрации масс-спектров в высоком разрешении в режиме регистрации положительных ионов все три метода: SFT (рис. 3), ICE (рис. 4А) и SSP (рис. 4Б) характеризуются схожими по составу и относительной интенсивности спектрами ионов, связанных с липидами (в диапазоне  $m/z$  600–900). Положительные ионы зарегистрированы в виде протонированных ионов или ионов, катионизированных

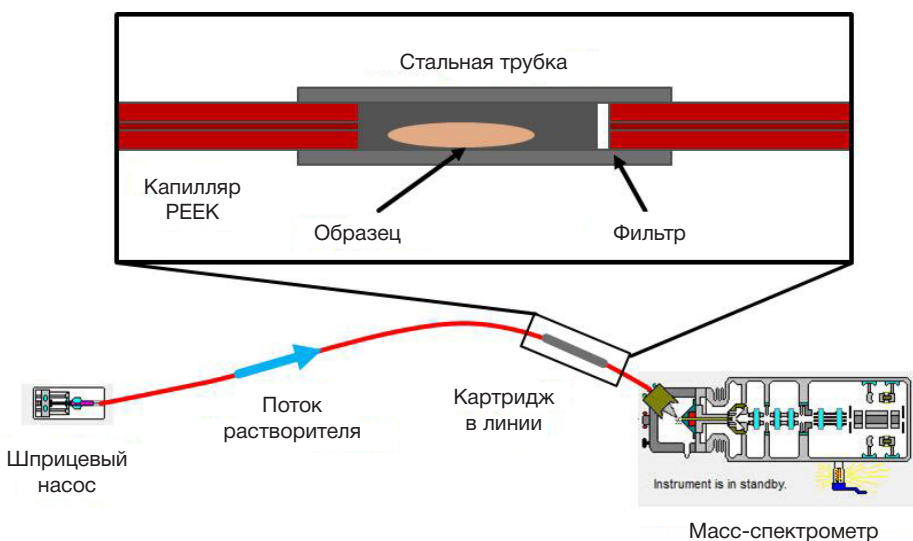
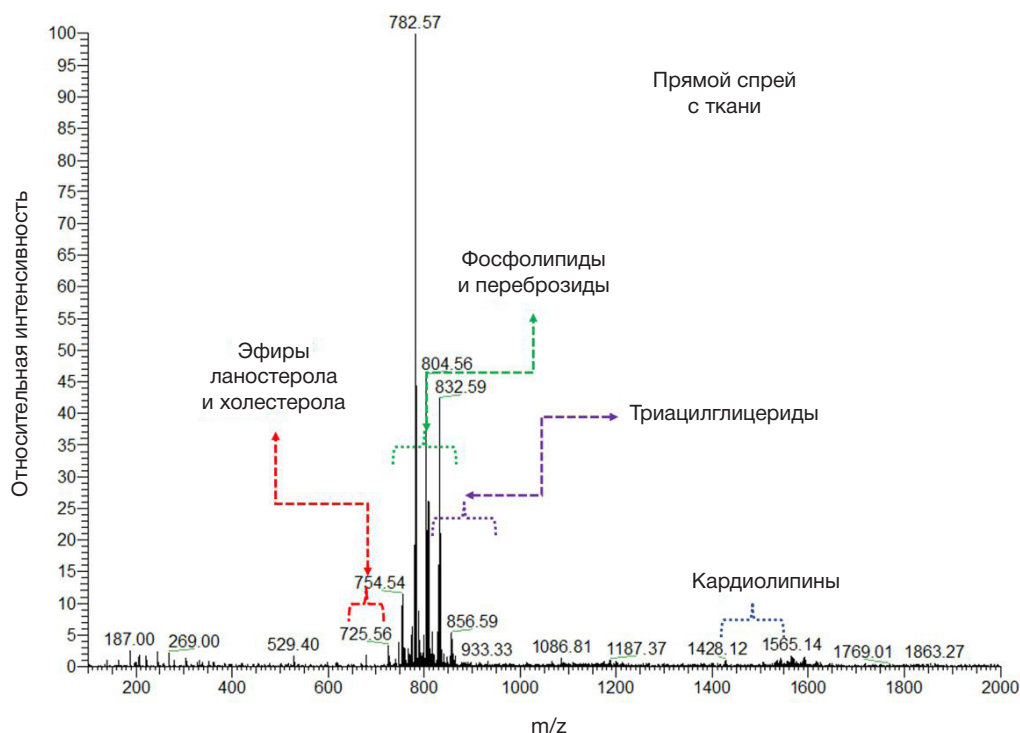


Рис. 2. Схема установки для экстракции в картридже (ICE)





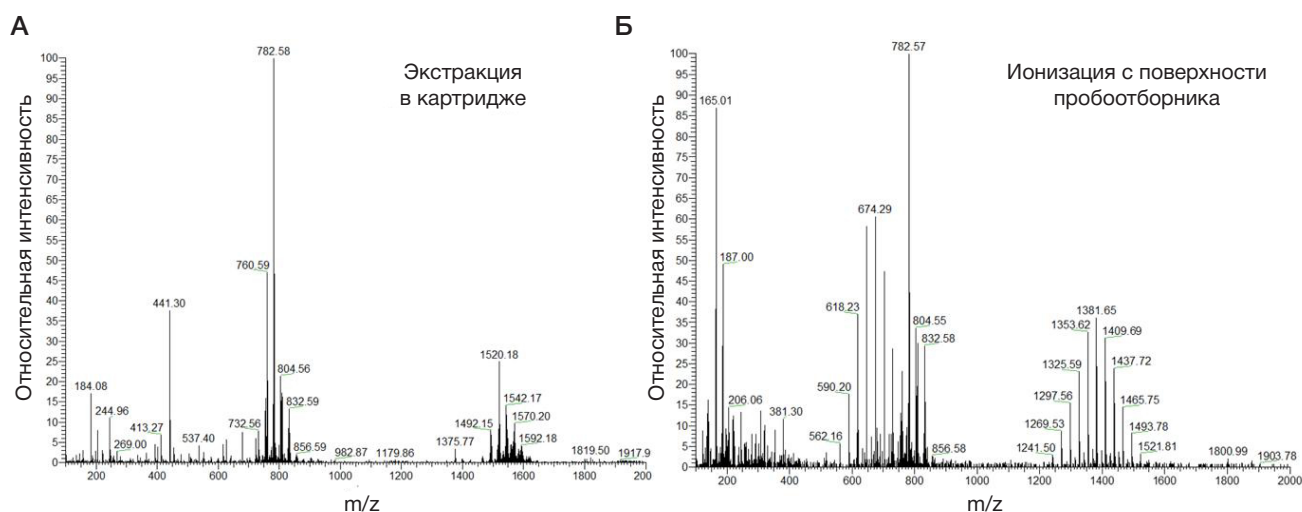
**Рис. 3.** Масс-спектр образцов менингиомы, полученный с помощью метода прямого спрея с ткани в высоком разрешении для режима регистрации положительных ионов

натрием или калием). В спектрах SFT не наблюдали интенсивную группу пиков в области  $m/z$  1450–1650, представляющую собой суперпозицию групп пиков, характерных как для кардиолипинов, так и для димеров мембранных липидов. Значения отношения сигнала к шуму близки у спектров SFT и ICE, а для пробоотборника этот показатель существенно (в 2–4 раза) ниже, что затрудняло поиск и анализ пиков малой интенсивности.

В низком разрешении для спектров положительных ионов наблюдается схожая картина. Для SFT также выявлена большая (приблизительно в 2,5 раза) интенсивность пиков липидов (рис. 5А), и, соответственно, меньшая относительная (но не абсолютная) интенсивность пиков в области  $m/z$  100–400 в сравнении с методом ICE (рис. 5Б), в то время как для SSP обнаружена сниженная интенсивность в характерной для липидов области спектра, но увеличенная интенсивность и разнообразие

пиков в области малых масс, в которой регистрируются метаболиты (рис. 5В).

Во всех спектрах для высокого разрешения в отрицательных ионах выявлены характерные пики липидов (рис. 6 и 7). Значения интенсивности сигналов молекул различных классов варьируют между методами в значительно меньшей степени, нежели в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Однако только для двух методов прямой ионизации (ICE и SSP) в спектрах удалось зарегистрировать ионы, соответствующие нейрометаболиту NAA, характерному для интактной нервной ткани [25, 26]. Присутствие данного метаболита свидетельствует о том, что исследованные образцы были взяты с границы опухоли. Для низкого разрешения в отрицательных ионах спектры, как и в высоком разрешении, похожи по представленным ионам липидов (результаты полностью аналогичны случаю



**Рис. 4.** Масс-спектры образцов менингиом, полученные с помощью метода ICE (А) и с помощью метода SSP (Б) в высоком разрешении для режима регистрации положительных ионов

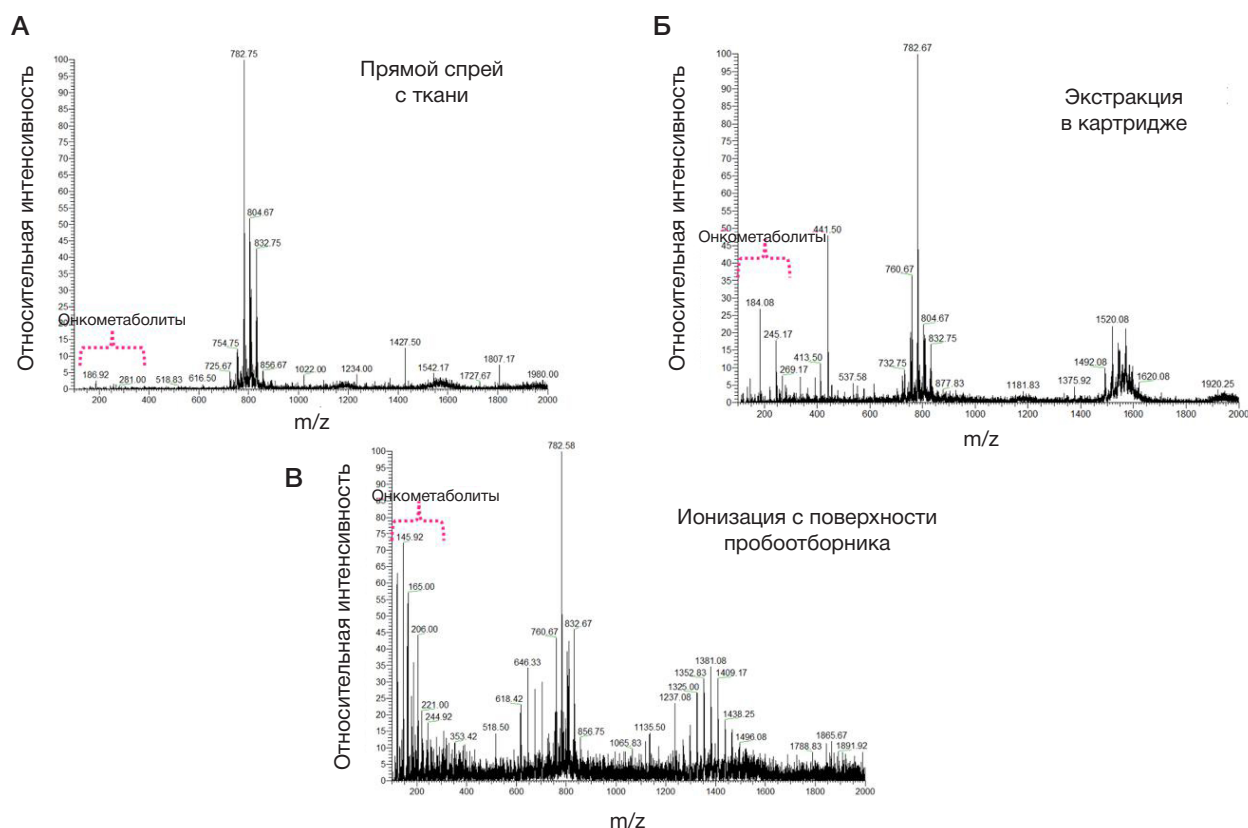


Рис. 5. Масс-спектры образцов менингиом, полученные с помощью SFT (А), ICE (Б) и SSP (В) в низком разрешении для режима регистрации положительных ионов

регистрации масс-спектров высокого разрешения и здесь не представлены). Однако NAA не удалось идентифицировать ни в одном из спектров, полученных в данном режиме.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Быстрый анализ ткани с помощью прямой масс-спектрометрии рассматривают как инструмент для молекулярной диагностики опухолей ЦНС. Несмотря на привлекательность методов молекулярного профилирования, встраиваемых в хирургический инструмент [11, 19], их применение сопряжено с недостатками, аналогичными применению интраоперационной томографии. Необходимость оборудования каждой операционной дорогостоящим масс-спектрометром, а также сложность сертификации подобных комплексов затрудняет их внедрение в клиническую практику. В то же время методы офлайн-анализа [13, 17], в которых образец ткани берут *in vivo* в процессе резекции, а затем анализируют *ex vivo* в патоморфологической лаборатории, легко встраиваются в рутинную практику, что обеспечивает быструю обратную связь хирургу для прецизионного иссечения опухоли. Будучи встроенным в стандартный процесс экспресс-гистологического исследования клинических образцов, молекулярное профилирование предоставляет информацию об иссекаемых тканях в течение минут, причем скорость-лимитирующей стадией оказывается время транспортировки образца между операционной и лабораторией.

Каждый из рассмотренных методов прямой ионизации опухолевых тканей обладает набором характерных особенностей. Так, метод SFT позволяет исключить какие-либо «эффекты памяти» (т. е. наличия остаточных

молекул предыдущего образца при анализе текущего, и их влияние на масс-спектр) за счет полностью одноразовых элементов источника ионов, контактирующих с анализируемым образцом. Однако стабильность ионизации, которая важна для получения надежных и повторяемых результатов исследования, оказывается зависимой от формы анализируемого образца ткани. Поскольку оболочечные опухоли головного мозга, как правило, имеют малую механическую жесткость и пластичны, контроль формы и размера образца представляется трудновыполнимой задачей, поэтому для каждого образца требуется дополнительная подстройка напряжения в ионном источнике, что снижает оперативность и требует значительной квалификации персонала.

Метод ICE, в свою очередь, обеспечивает высокую стабильность процесса ионизации за счет использования стандартного электрораспылительного источника масс-спектрометра. Ионные источники этого типа широко распространены и их применяют для анализа различных биологических молекул, в том числе используемых в медицинской диагностике. Однако необходимость промывки ионного источника между пробами также снижает производительность метода, поскольку недостаточная очистка ионного источника может приводить к кросс-контаминации между образцами и, следовательно, ошибочной идентификации онкометаболитов в исследуемой пробе.

Метод SSP, основанный на использовании одноразовых пробоотборников, позволяет нивелировать как проблему перекрестного загрязнения образцов, характерную для метода ICE, так и упростить процесс анализа в сравнении с SFT. Сферическая форма жестких пробоотборников обеспечивает постоянство геометрии ионного источника, а также облегчает процесс пробоотбора, который

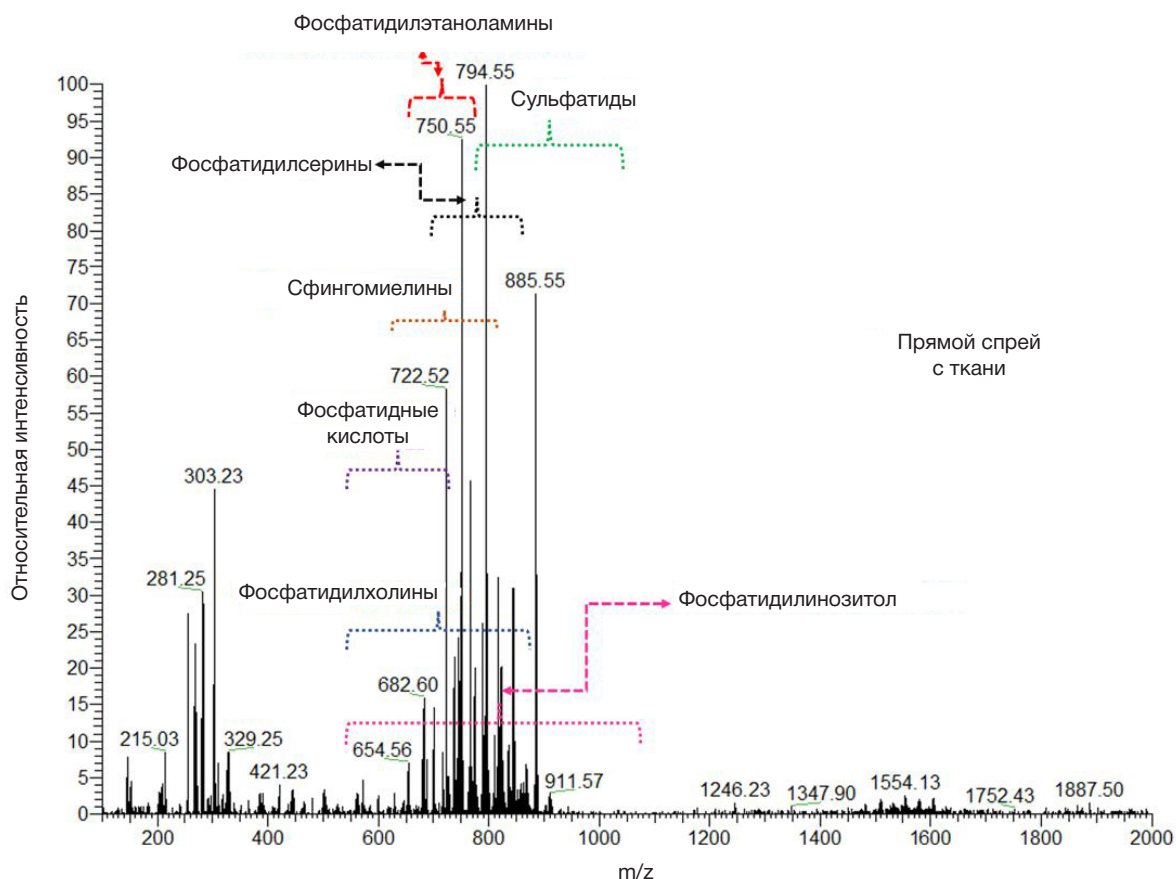


Рис. 6. Масс-спектр образцов менингиомы, полученный с помощью метода прямого спрея с ткани в высоком разрешении для режима регистрации отрицательных ионов

заключается только в касании образца кончиком пробоотборника. Инертность материалов, из которых изготовлен пробоотборник, тоже позволяет использовать его для отбора проб непосредственно в операционной в случае осуществления соответствующей сертификации. Несмотря на указанные преимущества, метод SSP менее эффективен для анализа липидной компоненты молекулярного профиля, ионизируемой в режиме

образования положительно-заряженных ионов. В первую очередь, к ним относятся фосфатидилхолины и другие компоненты клеточных мембран, которые значительно изменяются в процессе малигнизации. Однако в режиме регистрации отрицательно-заряженных ионов в спектре липидной компоненты наблюдаются, в частности, фосфатидилсерины, которые составляют значительную долю липидов в составе клеточных мембран интактной

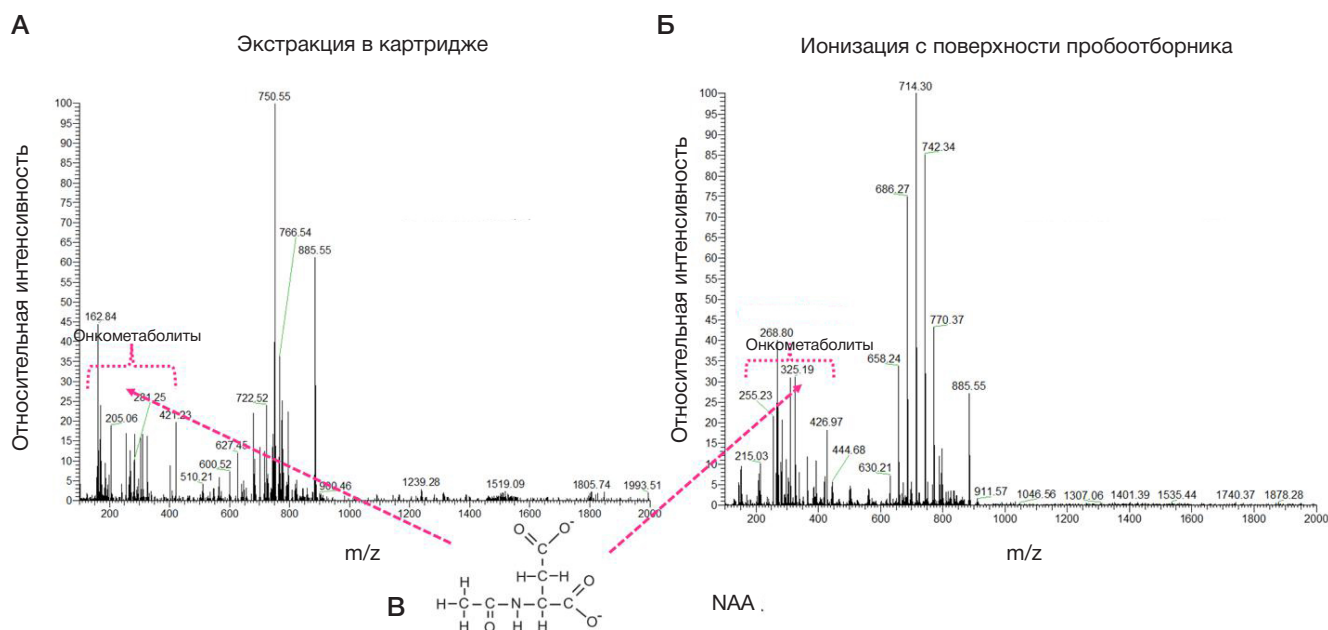


Рис. 7. Масс-спектры образцов менингиом, полученные с помощью методов ICE (А) и SSP (Б) в высоком разрешении для режима регистрации отрицательных ионов. В. Структурная формула нейрометаболита NAA

ткани головного мозга, что позволяет применять метод SSP для дифференциации опухолевой и интактной ткани по данным молекулярного профилирования.

В отличие от липидной компоненты, эффективность ионизации метаболитов малой массы, ионизируемых в диапазоне  $m/z$  100–400, оказалась сравнимой для всех методов ионизации. Однако метаболический профиль, полученный при помощи метода SFT, был менее разнообразным — в нем наблюдается меньшее число масс-спектрометрических пиков. В первую очередь, ни в одном из экспериментов с помощью этого метода не удалось обнаружить NAA, который был зарегистрирован при одновременном исследовании данных образцов с использованием других методов ионизации. Такой результат, по всей видимости, связан с менее эффективной экстракцией водорастворимых метаболитов из цельного образца ткани в процессе омывания его растворителем в процессе ионизации в сравнении с более полной экстракцией в картридже, либо с эффективным переносом аналитов умеренной гидрофобности на поверхность волокнистого пробоотборника.

Метод прямой экстракционной ионизации с использованием объемного пробоотборника в режиме регистрации отрицательных ионов, в свою очередь, перспективен для экспрессной хирургической оценки края резекции опухоли. Вследствие сравнительно высокой интенсивности ионов в данном диапазоне представляется возможным регистрировать онкометаболит, в частности NAA, и обеспечивать оценку инфильтрации опухоли,

которая имеет первостепенное значение при попытке максимизировать резекцию глиомы, что является благоприятным прогностическим фактором для пациентов с глиомой.

## ВЫВОДЫ

Применение различных методов прямой ионизации для исследования образцов оболочечных опухолей ЦНС позволяет получить достаточно интенсивный молекулярный профиль, пригодный для дифференциации опухолевых тканей от интактных, как было продемонстрировано ранее для глиальных опухолей. Метод спрея с ткани позволяет получать спектры липидной компоненты тканей с высокой производительностью. Метод картриджной экстракции наиболее прост для реализации, но обладает наименьшей производительностью анализа. Метод ионизации с поверхности сферического волокнистого пробоотборника ограниченно применим для анализа липидной фракции, но эффективен с точки зрения обнаружения онко- и нейрометаболитов, а также отличается простотой реализации. Таким образом, выбор метода ионизации для клинического применения напрямую зависит как от требований к простоте реализации и производительности анализа, предъявляемых к осуществляющей его лаборатории, так и от набора классов биологических молекул, липидов или водорастворимых метаболитов, в наибольшей степени характеризующих конкретную нозологию с учетом ее степени злокачественности.

## Литература

1. Islim AI, Mohan M, Moon RDC, Srikantharajah N, Mills SJ, Brodbelt AR, et al. Incidental intracranial meningiomas: a systematic review and meta-analysis of prognostic factors and outcomes. *J Neurooncol.* 2019; 142: 211–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03104-3>.
2. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro Oncol.* 2020; 22: iv1–96. Available from: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa200>.
3. Buerki RA, Horbinski CM, Kruser T, Horowitz PM, James CD, Lukas R v. An overview of meningiomas. *Future Oncology.* 2018; 14: 2161–77. Available from: <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0006>.
4. Ogasawara C, Philbrick BD, Adamson DC. Meningioma: A Review of Epidemiology, Pathology, Diagnosis, Treatment, and Future Directions. *Biomedicines.* 2021; 9: 319. Available from: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030319>.
5. Nguyen PX, Thi-Ngoc Doan H, van Vu H. Neuronavigation in falcine meningiomas are surgery: Initial results from a Vietnamese multicenter study. *Annals of Medicine and Surgery.* 2022: 104905. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104905>.
6. Bir SC, Konar SK, Maiti TK, Thakur JD, Guthikonda B, Nanda A. Utility of Neuronavigation in Intracranial Meningioma Resection: A Single-Center Retrospective Study. *World Neurosurg.* 2016; 90: 546–555.e1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2015.12.101>.
7. Stummer W, Koch R, Valle RD, Roberts DW, Sanai N, Kalkanis S, et al. Intraoperative fluorescence diagnosis in the brain: a systematic review and suggestions for future standards on reporting diagnostic accuracy and clinical utility. *Acta Neurochir (Wien).* 2019; 161: 2083–98. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00701-019-04007-y>.
8. Ila DR, Eberlin LS. Ambient ionization mass spectrometry for cancer diagnosis and surgical margin evaluation. *Clin Chem.* 2016; 62: 111–23. Available from: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.237172>.
9. Kiritani S, Yoshimura K, Arita J, Kokudo T, Hakoda H, Tanimoto M, et al. A new rapid diagnostic system with ambient mass spectrometry and machine learning for colorectal liver metastasis. *BMC Cancer.* 2021; 21: 262. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08001-5>.
10. Huang Y-C, Chung H-H, Dutkiewicz EP, Chen C-L, Hsieh H-Y, Chen B-R, et al. Predicting Breast Cancer by Paper Spray Ion Mobility Spectrometry Mass Spectrometry and Machine Learning. *Anal Chem.* 2020; 92: 1653–7. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03966>.
11. Phelps DL, Balog J, Gildea LF, Bodai Z, Savage A, El-Bahrawy MA, et al. The surgical intelligent knife distinguishes normal, borderline and malignant gynaecological tissues using rapid evaporative ionisation mass spectrometry (REIMS). *Br J Cancer.* 2018; 118: 1349–58. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0048-3>.
12. Ogrinc N, Attencourt C, Colin E, Boudahi A, Tebbakha R, Salzet M, et al. Mass Spectrometry-Based Differentiation of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma and Nontumor Regions With the SpiderMass Technology. *Frontiers in Oral Health.* 2022; 3. Available from: <https://doi.org/10.3389/froh.2022.827360>.
13. Pekov SI, Bormotov DS, Nikitin PV, Sorokin AA, Shurkhay VA, Eliferov VA, et al. Rapid estimation of tumor cell percentage in brain tissue biopsy samples using inline cartridge extraction mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2021; 413: 2913–22. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03220-y>.
14. Eberlin LS, Dill AL, Golby AJ, Ligon KL, Wiseman JM, Cooks RG, et al. Discrimination of human astrocytoma subtypes by lipid analysis using desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Angewandte Chemie — International Edition.* 2010; 49: 5953–6. Available from: <https://doi.org/10.1002/>



- anie.201001452.
15. Pirro V, Llor RS, Jarmusch AK, Alfaro CM, Cohen-Gadol AA, Hattab EM, et al. Analysis of human gliomas by swab touch spray-mass spectrometry: Applications to intraoperative assessment of surgical margins and presence of oncometabolites. *Analyst*. 2017; 142: 4058–66. Available from: <https://doi.org/10.1039/c7an01334e>.
  16. Jarmusch AK, Pirro V, Baird Z, Hattab EM, Cohen-Gadol AA, Cooks RG. Lipid and metabolite profiles of human brain tumors by desorption electrospray ionization-MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016; 113: 1486–91. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1523306113>.
  17. Pekov SI, Eliferov VA, Sorokin AA, Shurkhay VA, Zhvansky ES, Vorobyev AS, et al. Inline cartridge extraction for rapid brain tumor tissue identification by molecular profiling. *Sci Rep*. 2019; 9: 18960. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55597-7>.
  18. Pirro V, Jarmusch AK, Alfaro CM, Hattab EM, Cohen-Gadol AA, Cooks RG. Utility of neurological smears for intrasurgical brain cancer diagnostics and tumour cell percentage by DESI-MS. *Analyst*. 2017; 142: 449–54. Available from: <https://doi.org/10.1039/c6an02645a>.
  19. Keating MF, Zhang J, Feider CL, Retailleau S, Reid R, Antaris A, et al. Integrating the MasSpec Pen to the da Vinci Surgical System for in Vivo Tissue Analysis during a Robotic Assisted Porcine Surgery. *Anal Chem*. 2020; 92: 11535–42. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02037>.
  20. Shamraeva MA, Pekov SI, Bormotov DS, Levin RE, Larina IM, Nikolaev EN, et al. The lightweight spherical samplers for simplified collection, storage, and ambient ionization of drugs from saliva and blood. *Acta Astronaut*. 2022; 195: 556–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actastro.2022.03.026>.
  21. Shamraeva MA, Bormotov DS, Shamarina EV, Bocharov KV, Peregodova OV, Pekov SI, et al. Spherical Sampler Probes Enhance the Robustness of Ambient Ionization Mass Spectrometry for Rapid Drugs Screening. *Molecules*. 2022; 27: 945. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules27030945>.
  22. Chagovets V, Wang Z, Kononikhin A, Starodubtseva N, Borisova A, Salimova D, et al. A Comparison of Tissue Spray and Lipid Extract Direct Injection Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Differentiation of Eutopic and Ectopic Endometrial Tissues. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2017; 6–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1792-y>.
  23. Adamyan L, Starodubtseva N, Borisova A, Stepanian A, Chagovets V, Salimova D, et al. Direct Mass Spectrometry Differentiation of Ectopic and Eutopic Endometrium in Patients with Endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2017. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmig.2017.08.658>.
  24. Hutchins PD, Russell JD, Coon JJ. LipiDex: An Integrated Software Package for High-Confidence Lipid Identification. *Cell Syst*. 2018; 6: 621–5.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.03.011>.
  25. Bogner-Strauss JG. N-acetylaspartate metabolism outside the brain: Lipogenesis, histone acetylation, and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017; 8: 1–5. Available from: <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00240>.
  26. Pirro V, Alfaro CM, Jarmusch AK, Hattab EM, Cohen-Gadol AA, Cooks RG. Intraoperative assessment of tumor margins during glioma resection by desorption electrospray ionization-mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017; 114: 201706459. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1706459114>.
- ## References
1. Islim AI, Mohan M, Moon RDC, Srikantharajah N, Mills SJ, Brodbelt AR, et al. Incidental intracranial meningiomas: a systematic review and meta-analysis of prognostic factors and outcomes. *J Neurooncol*. 2019; 142: 211–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03104-3>.
  2. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro Oncol*. 2020; 22: iv1–96. Available from: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa200>.
  3. Buerki RA, Horbinski CM, Kruser T, Horowitz PM, James CD, Lukas R v. An overview of meningiomas. *Future Oncology*. 2018; 14: 2161–77. Available from: <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0006>.
  4. Ogasawara C, Philbrick BD, Adamson DC. Meningioma: A Review of Epidemiology, Pathology, Diagnosis, Treatment, and Future Directions. *Biomedicines*. 2021; 9: 319. Available from: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030319>.
  5. Nguyen PX, Thi-Ngoc Doan H, van Vu H. Neuronavigation in falcine meningiomas are surgery: Initial results from a Vietnamese multi-center study. *Annals of Medicine and Surgery*. 2022: 104905. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104905>.
  6. Bir SC, Konar SK, Maiti TK, Thakur JD, Guthikonda B, Nanda A. Utility of Neuronavigation in Intracranial Meningioma Resection: A Single-Center Retrospective Study. *World Neurosurg*. 2016; 90: 546–555.e1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2015.12.101>.
  7. Stummer W, Koch R, Valle RD, Roberts DW, Sanai N, Kalkanis S, et al. Intraoperative fluorescence diagnosis in the brain: a systematic review and suggestions for future standards on reporting diagnostic accuracy and clinical utility. *Acta Neurochir (Wien)*. 2019; 161: 2083–98. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00701-019-04007-y>.
  8. Ila DR, Eberlin LS. Ambient ionization mass spectrometry for cancer diagnosis and surgical margin evaluation. *Clin Chem*. 2016; 62: 111–23. Available from: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.237172>.
  9. Kiritani S, Yoshimura K, Arita J, Kokudo T, Hakoda H, Tanimoto M, et al. A new rapid diagnostic system with ambient mass spectrometry and machine learning for colorectal liver metastasis. *BMC Cancer*. 2021; 21: 262. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08001-5>.
  10. Huang Y-C, Chung H-H, Dutkiewicz EP, Chen C-L, Hsieh H-Y, Chen B-R, et al. Predicting Breast Cancer by Paper Spray Ion Mobility Spectrometry Mass Spectrometry and Machine Learning. *Anal Chem*. 2020; 92: 1653–7. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03966>.
  11. Phelps DL, Balog J, Gildea LF, Bodai Z, Savage A, El-Bahrawy MA, et al. The surgical intelligent knife distinguishes normal, borderline and malignant gynaecological tissues using rapid evaporative ionisation mass spectrometry (REIMS). *Br J Cancer*. 2018; 118: 1349–58. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0048-3>.
  12. Ogrinc N, Attencourt C, Colin E, Boudahi A, Tebbakha R, Salzet M, et al. Mass Spectrometry-Based Differentiation of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma and Nontumor Regions With the SpiderMass Technology. *Frontiers in Oral Health*. 2022; 3. Available from: <https://doi.org/10.3389/froh.2022.827360>.
  13. Pekov SI, Bormotov DS, Nikitin PV, Sorokin AA, Shurkhay VA, Eliferov VA, et al. Rapid estimation of tumor cell percentage in brain tissue biopsy samples using inline cartridge extraction mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2021; 413: 2913–22. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03220-y>.
  14. Eberlin LS, Dill AL, Golby AJ, Ligon KL, Wiseman JM, Cooks RG, et al. Discrimination of human astrocytoma subtypes by lipid analysis using desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Angewandte Chemie — International Edition*. 2010; 49: 5953–6. Available from: <https://doi.org/10.1002/anie.201001452>.
  15. Pirro V, Llor RS, Jarmusch AK, Alfaro CM, Cohen-Gadol AA, Hattab EM, et al. Analysis of human gliomas by swab touch spray-mass spectrometry: Applications to intraoperative assessment of surgical margins and presence of oncometabolites. *Analyst*. 2017; 142: 4058–66. Available from: <https://doi.org/10.1039/c7an01334e>.
  16. Jarmusch AK, Pirro V, Baird Z, Hattab EM, Cohen-Gadol AA,

- Cooks RG. Lipid and metabolite profiles of human brain tumors by desorption electrospray ionization-MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016; 113: 1486–91. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1523306113>.
17. Pekov SI, Elifirov VA, Sorokin AA, Shurkhay VA, Zhvansky ES, Vorobyev AS, et al. Inline cartridge extraction for rapid brain tumor tissue identification by molecular profiling. *Sci Rep*. 2019; 9: 18960. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55597-7>.
  18. Pirro V, Jarmusch AK, Alfaro CM, Hattab EM, Cohen-Gadol AA, Cooks RG. Utility of neurological smears for intrasurgical brain cancer diagnostics and tumour cell percentage by DESI-MS. *Analyst*. 2017; 142: 449–54. Available from: <https://doi.org/10.1039/c6an02645a>.
  19. Keating MF, Zhang J, Feider CL, Retaillieu S, Reid R, Antaris A, et al. Integrating the MasSpec Pen to the da Vinci Surgical System for in Vivo Tissue Analysis during a Robotic Assisted Porcine Surgery. *Anal Chem*. 2020; 92: 11535–42. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02037>.
  20. Shamraeva MA, Pekov SI, Bormotov DS, Levin RE, Larina IM, Nikolaev EN, et al. The lightweight spherical samplers for simplified collection, storage, and ambient ionization of drugs from saliva and blood. *Acta Astronaut*. 2022; 195: 556–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2022.03.026>.
  21. Shamraeva MA, Bormotov DS, Shamarina EV, Bocharov KV, Peregudova OV, Pekov SI, et al. Spherical Sampler Probes Enhance the Robustness of Ambient Ionization Mass Spectrometry for Rapid Drugs Screening. *Molecules*. 2022; 27: 945. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules27030945>.
  22. Chagovets V, Wang Z, Kononikhin A, Starodubtseva N, Borisova A, Salimova D, et al. A Comparison of Tissue Spray and Lipid Extract Direct Injection Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Differentiation of Eutopic and Ectopic Endometrial Tissues. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2017; 6–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1792-y>.
  23. Adamyan L, Starodubtseva N, Borisova A, Stepanian A, Chagovets V, Salimova D, et al. Direct Mass Spectrometry Differentiation of Ectopic and Eutopic Endometrium in Patients with Endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2017. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmig.2017.08.658>.
  24. Hutchins PD, Russell JD, Coon JJ. LipiDex: An Integrated Software Package for High-Confidence Lipid Identification. *Cell Syst*. 2018; 6: 621–5.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.03.011>.
  25. Bogner-Strauss JG. N-acetylaspartate metabolism outside the brain: Lipogenesis, histone acetylation, and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017; 8: 1–5. Available from: <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00240>.
  26. Pirro V, Alfaro CM, Jarmusch AK, Hattab EM, Cohen-Gadol AA, Cooks RG. Intraoperative assessment of tumor margins during glioma resection by desorption electrospray ionization-mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017; 114: 201706459. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1706459114>.

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ МРНК-ЛНЧ-ВАКЦИН НА НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ У BALB/C МЫШЕЙ

А. С. Киршина<sup>1</sup>, А. А. Казакова<sup>1</sup>, Е. С. Колосова<sup>1</sup>, Е. А. Имашева<sup>1</sup>, О. О. Васильева<sup>1</sup>, О. В. Заборова<sup>1,2</sup>, И. М. Теренин<sup>1,3</sup>, А. Р. Муслимов<sup>1,4</sup>, В. В. Решетников<sup>1,5</sup>✉

<sup>1</sup> Научный центр трансляционной медицины, «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>4</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

Доказана высокая эффективность мРНК-вакцин в борьбе с эпидемией COVID-19, продемонстрирована низкая частота развития побочных эффектов. Тем не менее существует еще много пробелов в нашем понимании биологии и биобезопасности нуклеиновых кислот в составе липидных наночастиц (ЛНЧ), наиболее часто используемых в качестве системы внутриклеточной доставки вакцин на основе мРНК. Известно, что ЛНЧ приводят к сильному воспалительному ответу в месте введения, имеют широкий профиль биораспределения и обнаруживаются после введения во многих тканях организма, в том числе в головном мозге. Роль новых препаратов с такой фармакокинетикой в воспалительных процессах, развивающихся в забарьерных органах изучена недостаточно. Целью исследования было оценить влияние различных доз мРНК-ЛНЧ, экспрессирующих репортерный белок (0, 5, 10 и 20 мкг мРНК, кодирующей люциферазу светлячка) на экспрессию маркеров нейровоспаления (*Tnfrα*, *Il1β*, *Gfap*, *Aif1*) в префронтальной коре и гипоталамусе лабораторных животных через 4, 8 и 30 ч после внутримышечной инъекции наноземульсии ЛНЧ. Показано, что мРНК-ЛНЧ-вакцины в дозе 10–20 мкг мРНК способны усиливать экспрессию *Aif1* в гипоталамусе через 8 ч после вакцинации, но через 30 ч эти различия не определялись. Обнаружено, что уровень экспрессии *Gfap*, *Il1β*, *Tnfrα* в экспериментальных группах различался в различных временных точках в гипоталамусе. Согласно полученным результатам, введенные парентерально мРНК-ЛНЧ могут стимулировать временную активацию микроглии в определенных временных промежутках дозо- и регион-зависимым образом.

**Ключевые слова:** мРНК-вакцины, нейровоспаление, липидные наночастицы, *Aif1*, *Gfap*

**Финансирование:** исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-113, уникальный идентификатор проекта РФ----193021X0001).

**Вклад авторов:** А. С. Киршина — выделение РНК, постановка ПЦР реакций; А. А. Казакова, Е. С. Колосова, Е. А. Имашева, О. О. Васильева — получение генетических конструкций, выделение РНК, написание статьи; О. В. Заборова — формулировка РНК в ЛНЧ, написание статьи; И. М. Теренин — синтез РНК, написание статьи; А. Р. Муслимов — эксперимент с животными, редактирование текста; В. В. Решетников — эксперимент с животными, анализ данных, подготовка рисунков, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ПСПбГМУ им. И. П. Павлова (протокол № 83 от 21 сентября 2022 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, 8<sup>th</sup> 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:** Василий Владимирович Решетников  
Олимпийский пр-кт, д. 1, г. Сочи, 354340, Россия; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

**Статья получена:** 01.12.2022 **Статья принята к печати:** 15.12.2022 **Опубликована онлайн:** 30.12.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.068

## EFFECTS OF VARIOUS MRNA-LNP VACCINE DOSES ON NEUROINFLAMMATION IN BALB/C MICE

Kirshina AS<sup>1</sup>, Kazakova AA<sup>1</sup>, Kolosova ES<sup>1</sup>, Imasheva EA<sup>1</sup>, Vasileva OO<sup>1</sup>, Zaborova OV<sup>1,2</sup>, Terenin IM<sup>1,3</sup>, Muslimov AR<sup>1,4</sup>, Reshetnikov VV<sup>1,5</sup>✉

<sup>1</sup> Research Center for Translational Medicine, Sirius University of Science and Technology, Sirius, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

<sup>5</sup> Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

It has been proven that mRNA vaccines are highly effective against the COVID-19 outbreak, and low prevalence of side effects has been shown. However, there are still many gaps in our understanding of the biology and biosafety of nucleic acids as components of lipid nanoparticles (LNPs) most often used as a system for intracellular delivery of mRNA-based vaccines. It is known that LNPs cause severe injection site inflammation, have broad biodistribution profiles, and are found in multiple tissues of the body, including the brain, after administration. The role of new medications with such pharmacokinetics in inflammation developing in inaccessible organs is poorly understood. The study was aimed to assess the effects of various doses of mRNA-LNP expressing the reporter protein (0, 5, 10, and 20 µg of mRNA encoding the firefly luciferase) on the expression of neuroinflammation markers (*Tnfrα*, *Il1β*, *Gfap*, *Aif1*) in the prefrontal cortex and hypothalamus of laboratory animals 4, 8, and 30 h after the intramuscular injection of LNP nanoemulsion. It was shown that mRNA-LNP vaccines in a dose of 10–20 µg of mRNA could enhance *Aif1* expression in the hypothalamus 8 h after vaccination, however, no such differences were observed after 30 h. It was found that the *Gfap*, *Il1β*, *Tnfrα* expression levels in the hypothalamus observed at different times in the experimental groups were different. According to the results, mRNA-LNPs administered by the parenteral route can stimulate temporary activation of microglia in certain time intervals in the dose-dependent and site specific manner.

**Keywords:** mRNA vaccine, neuroinflammation, lipid nanoparticles, *Aif1*, *Gfap*

**Funding:** the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement № 075-10-2021-113, project ID RF--193021X0001).

**Author contribution:** Kirshina AS — RNA extraction, conducting PCR; Kazakova AA, Kolosova ES, Imasheva EA, Vasileva OO — generating genetic constructs, RNA extraction, manuscript writing; Zaborova OV — RNA formulation in LNP, manuscript writing; Terenin IM — RNA synthesis, manuscript writing; Muslimov AR — animal experiment, manuscript editing; Reshetnikov VV — animal experiment, data analysis, preparing illustrations, manuscript wr

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of Pavlov First St. Petersburg State Medical University (protocol № 83 of 21 September 2022); it was conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123, Strasbourg, 1986, with the 2006 Appendix), international convention on the humane treatment of animals (1986), Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8<sup>th</sup> ed. (2010); Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes (2010), Principles of Good Laboratory Practice (2016).

✉ **Correspondence should be addressed:** Vasily V. Reshetnikov  
Olimpiyskiy prospekt, 1, Sochi, 354340, Russia; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

**Received:** 01.12.2022 **Accepted:** 15.12.2022 **Published online:** 30.12.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.068

Успехи в разработке мРНК-вакцин (ЛНЧ) позволили менее чем за год получить две одобренные FDA вакцины (Pfizer/BioNTech и Moderna) против вируса SARS-CoV-2 [1, 2]. Препараты на основе мРНК-ЛНЧ могут быть использованы как для терапии ряда социально значимых заболеваний, так и в качестве профилактических вакцин против многих инфекционных возбудителей. Гибкость платформы мРНК-ЛНЧ обусловлена возможностью специфического выбора последовательности антигена в составе молекулы мРНК, а также за счет различных вариантов состава липидов и их соотношения в ЛНЧ, которые могут модулировать эффективность и иммуногенность мРНК вакцин [3]. Липидные частицы Pfizer/BioNTech и Moderna включают в себя заряженные ионизированные липиды, нейтральные ионизируемые липиды, полиэтиленгликоль-содержащие липиды, холестерин и дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) [4]. ЛНЧ обеспечивают интернализацию мРНК-ЛНЧ в клетку и играют адьювантную роль, стимулируя умеренное усиление воспаления в месте введения [3]. Показано, что центральную роль в индукции воспаления, вызванного ЛНЧ, могут играть различные варианты ионизируемых липидов, которые распознаются toll-like-рецепторами 4-го типа (TLR-4) [5]. Кроме того, молекула мРНК в составе вакцины может обладать провоспалительными свойствами через TLR-3,7,8, RIG-I, MDA5 [6, 7]. Умеренная провоспалительная активность способствует эффективной презентации антигенов на поверхности антигенпрезентирующих клеток и формированию гуморального и Т-клеточного иммунитета. Однако в некоторых случаях воспаление может приводить к нежелательным эффектам. В частности, недавние исследования показали, что ЛНЧ приводят к сильному воспалительному ответу в месте введения, имеют широкий профиль распределения в организме и обнаруживаются во многих тканях, в том числе в головном мозге [4, 8]. Беспрепятственное прохождение гематоэнцефалического барьера в совокупности с провоспалительными свойствами могут вызывать нежелательные явления в виде иммунной активации в центральной нервной системе. Целью исследования была динамическая оценка маркеров

нейровоспаления в префронтальной коре и гипоталамусе у лабораторных мышей линии Balb/c после введения различных доз мРНК-ЛНЧ вакцин.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Экспериментальный дизайн

В эксперименте на конвенциональных условиях использовали 75 взрослых самцов (в возрасте 9–10 недель, весом 19–22 г) Balb/c, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» ПАМН (Санкт-Петербург, Россия) и содержащихся в Центре экспериментальной фармакологии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета при фиксированном световом режиме 12.00 : 12.00 ч. Стандартный корм (гранулы) и воду животные получали без ограничения. Перед исследованием животных распределили в исследовательские группы путем рандомизации. Инъекция различных доз мРНК-ЛНЧ (три концентрации — 5, 10 и 20 мкг РНК) или контрольных (пустых) ЛНЧ в фосфатном буфере производили внутримышечно в объеме 30 мкл. Спустя 4, 8 и 30 ч после введения взвеси частиц животные получали ингаляцию 2,0% изофлюрана (Laboratories Karizoo, S.A.; Испания) в смеси с кислородом в течение 5 мин, а затем подвергали декапитации (рис. 1). Образцы гипоталамуса и префронтальной коры (ПФК) выделяли, как описано ранее [9]. Контрольным животным был введен аналогичный объем (30 мкл) фосфатного буфера. В каждой группе на каждую экспериментальную точку использовали по пять животных.

### Клонирование

Амплификацию целевого гена, содержащего последовательность 5'-UTR Moderna (gggaaataagagagaaaa gaagagtaagaagaataataagaccccgccgcccacc), кодирующую последовательность люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*) и 3'-UTR Moderna (gctggagcctcggtggcctagctcttg cccttgggctccccccagccctcctccctcctgcaccgtagccccgtgt

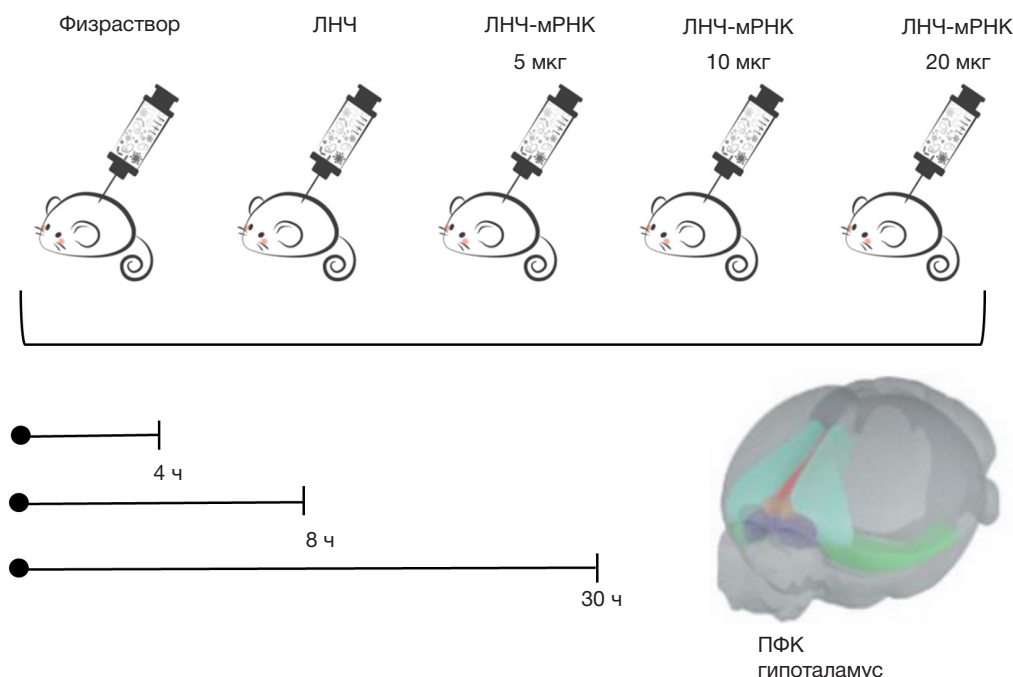


Рис. 1. Дизайн эксперимента



Таблица. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов

Ген	Последовательность 5'→3'	
<i>Aif1</i>	Probe	ROX-AGAGAGGCTGGAGGGGATC-BHQ2
	For	GCTTTTGGACTGCTGAAGGC
	Rev	GAAGGCTTCAAGTTTGGACG
<i>Gfap</i>	Probe	ROX-GCAAGAGACAGAGGAGTGG-BHQ-2
	For	CCTGAGAGAGATTTCGCACTC
	Rev	GAAGGCTTCAAGTTTGGACG
<i>TNFα</i>	Probe	ROX-CGAGTGACAAGCCTGTAGC-BHQ2
	For	CATCAGTTCTATGGCCAGACCCCT
	Rev	GCTCCTCCACTTGGTGGTTTGCTA
<i>Il1β</i>	Probe	ROX-CTGCTTCCAAACCTTTGACCTGG-BHQ2
	For	CCTGTTCTTTGAAGTTGACGG
	Rev	CTGAAGCTCTTGTGATGTGC
<i>Gapdh</i>	Probe	CCATCAACGACCCCTTCATTGACCTC
	For	TGCAGTGGCAAAGTGGAGAT
	Rev	TGCCGTGAGTGGAGTCATACT

ctttgaataaagtctgagtgggcgga), осуществляли путем сшивки трех фрагментов методом ПЦР с перекрывающимися праймерами. Затем полученный фрагмент инкубировали с эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *BglIII*, очищали на агарозном геле и осуществляли лигирование с аналогично подготовленным коммерческим вектором pSmart (Lucigen; США). Вектор содержал polyA-хвост длиной 110. Для трансформации использовали штамм *E. coli* NEB-stable (New England Biolabs; UK). Клоны отбирали методом ПЦР с колоний и подтверждали последовательность вставки секвенированием. Культивирование *E. coli* для наработки верифицированной плазмиды проводили на шейкере-инкубаторе при 30 °C и 180 оборотах в минуту. Затем с помощью набора QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen; США) выделяли плазмидную ДНК из бактериальных клеток. Полученный препарат плазмиды линейаризовали по уникальному сайту рестрикции *SpeI* с последующей визуализацией в агарозном геле.

#### In vitro транскрипция мРНК

In vitro транскрипцию проводили в буфере, содержащем 20 mM DTT, 2 mM спермидина, 80 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 24 mM MgCl<sub>2</sub>. Реакционная смесь содержала также по 3 mM каждого из рибонуклеозидтрифосфатов («Биосан»; Россия), 12 mM аналога кэпа ARCA («Биолабмикс»; Россия). Остальные компоненты из расчета на 100 мкл реакции: 40 единиц ингибитора рибонуклеаз RiboCare («Евроген»; Россия), 500 единиц T7 РНК-полимеразы («Биолабмикс»; Россия), 5 мкг линейаризованной плазмиды и 1 мкл смеси ферментов из набора RiboMAX Large Scale RNA Production System (Promega; США) в качестве источника неорганической пирофосфатазы. Реакцию проводили 2 ч при температуре 37 °C, после чего в реакцию добавляли еще по 3 mM каждого из рибонуклеозидтрифосфатов и инкубировали в течение еще 2 ч. ДНК гидролизировали при помощи нуклеазы RQ1 (Promega; США), РНК преципитировали добавлением LiCl до концентрации 0,32M и EDTA pH 8,0 до концентрации 20 mM с последующей инкубацией на льду в течение часа. Далее раствор центрифугировали 15 мин (25 000 g, 4 °C). Осадок РНК промывали 70%-м этанолом, растворяли в

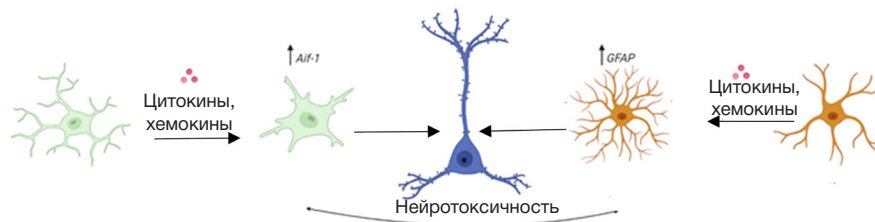
ультрачистой воде и еще раз преципитировали спиртом по стандартной методике. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм.

#### Формуляция мРНК в ЛНЧ

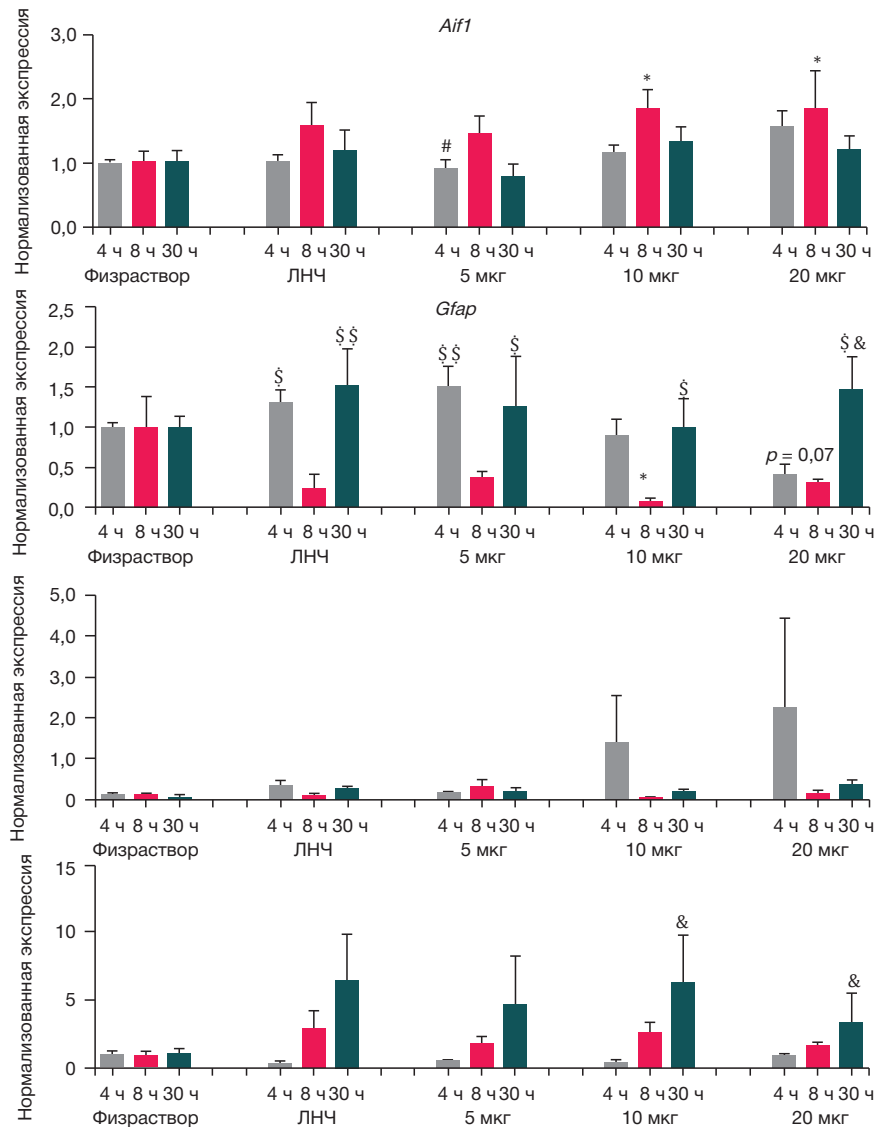
Формулирование мРНК в липидные наночастицы проводили путем смешивания водного раствора (10 mM цитратный буфер, pH 3,0) 0,2 мг/мл мРНК со спиртовым раствором смеси липидов в микрофлюидном картридже на приборе The NanoAssemblr™ Benchtop (Precision Nanosystems; США). Липидная смесь содержала следующие компоненты: ионизируемый липид ALC-0315 (BroadPharm; США), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) (Avanti Polar Lipids; США), холестерин (Sigma-Aldrich; США), DMG-PEG-2000 (BroadPharm; США) в молярном соотношении (%) 46,3 : 9,4 : 42,7 : 1,6. Количество липидов на единицу мРНК рассчитывали из соотношения N/P = 6 (ионизируемый липид ALC-0315 к основанию мРНК). Для формирования частиц требуемого размера водную и спиртовую фазы смешивали в соотношении 3 : 1 по объему с общей скоростью смешивания 10 мл/мин. После смешения фаз полученную водно-спиртовую суспензию частиц диализировали в 300 объемах фосфатно-солевого буфера (pH 7,4, 18 ч, +15 °C). После диализа суспензию частиц концентрировали, используя фильтры Amicon Ultra-4 с отсечением MW10 000. Затем частицы фильтровали в стерильных условиях через фильтр с мембраной из PES 0,22 мкм (Merck; США) и хранили при 4 °C. Пустые ЛНЧ получали путем смешивания 10 mM цитратного буферного раствора (pH 3,0) со спиртовым раствором смеси липидов в микрофлюидном картридже аналогично получению мРНК-ЛНЧ.

После фильтрации качество полученных частиц анализировали по двум параметрам: загрузка мРНК и размер частиц. Концентрацию загруженной в липидные наночастицы мРНК определяли по разнице значений уровня флуоресцентного сигнала при окрашивании реагентом RiboGreen (Thermo Fischer Scientific; США) суспензии частиц до их разрушения и после. Для разрушения частиц использовали детергент Triton X-100

A



Б



**Рис. 2.** Экспрессия генов маркеров нейровоспаления в гипоталамусе. **А.** Реакция астроглии и микроглии на острое временное введение. **Б.** Относительный уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*Il1β*, *Tnfa*) и маркеров активации глии (*Aif1*, *Gfap*) в различных временных точках после введения мРНК-ЛНЧ-вакцины. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего. \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , в сравнении с группой, в которой вводили физраствор в аналогичной временной точке; # —  $p < 0,05$ , в сравнении с группой, в которой вводили 20 мкг мРНК-ЛНЧ в аналогичной временной точке; \$ —  $p < 0,05$ , \$\$\$\$ —  $p < 0,01$ , по сравнению с точкой через 8 ч после введения; & —  $p < 0,05$ , по сравнению с точкой через 4 ч после введения. Post hoc анализ с использованием критерия Fisher's LSD

(Sigma-Aldrich; США). Размер ЛНЧ определяли методом динамического рассеяния света на приборе Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalitycal; США).

#### Оценка уровня экспрессии генов в мозге

Выделение суммарной РНК проводили из ПФК и гипоталамуса с использованием набора для выделения РНК на колонках («Биолабмикс»; Россия) согласно протоколу производителя. Для определения концентрации РНК и степени ее очистки от белков был использован спектрофотометр NanoDrop OneC (Thermo Scientific; США).

Для реакции обратной транскрипции брали 500 нг РНК и использовали набор для обратной транскрипции ОТ-М-MuLV-RH («Биолабмикс»; Россия) с случайными гексануклеотидными праймерами. Полученную кДНК использовали для оценки уровня экспрессии генов. В качестве маркеров нейровоспаления оценивали экспрессию генов провоспалительных цитокинов и интерлейкинов (*Il1β*, *Tnfa*), генов-маркеров активации микроглии (*Aif1*) и астроглии (*Gfap*). В работе использовали метод количественного ПЦР-анализа с флуоресцентными зондами Taq-man. Последовательности праймеров и зондов представлены в таблице.

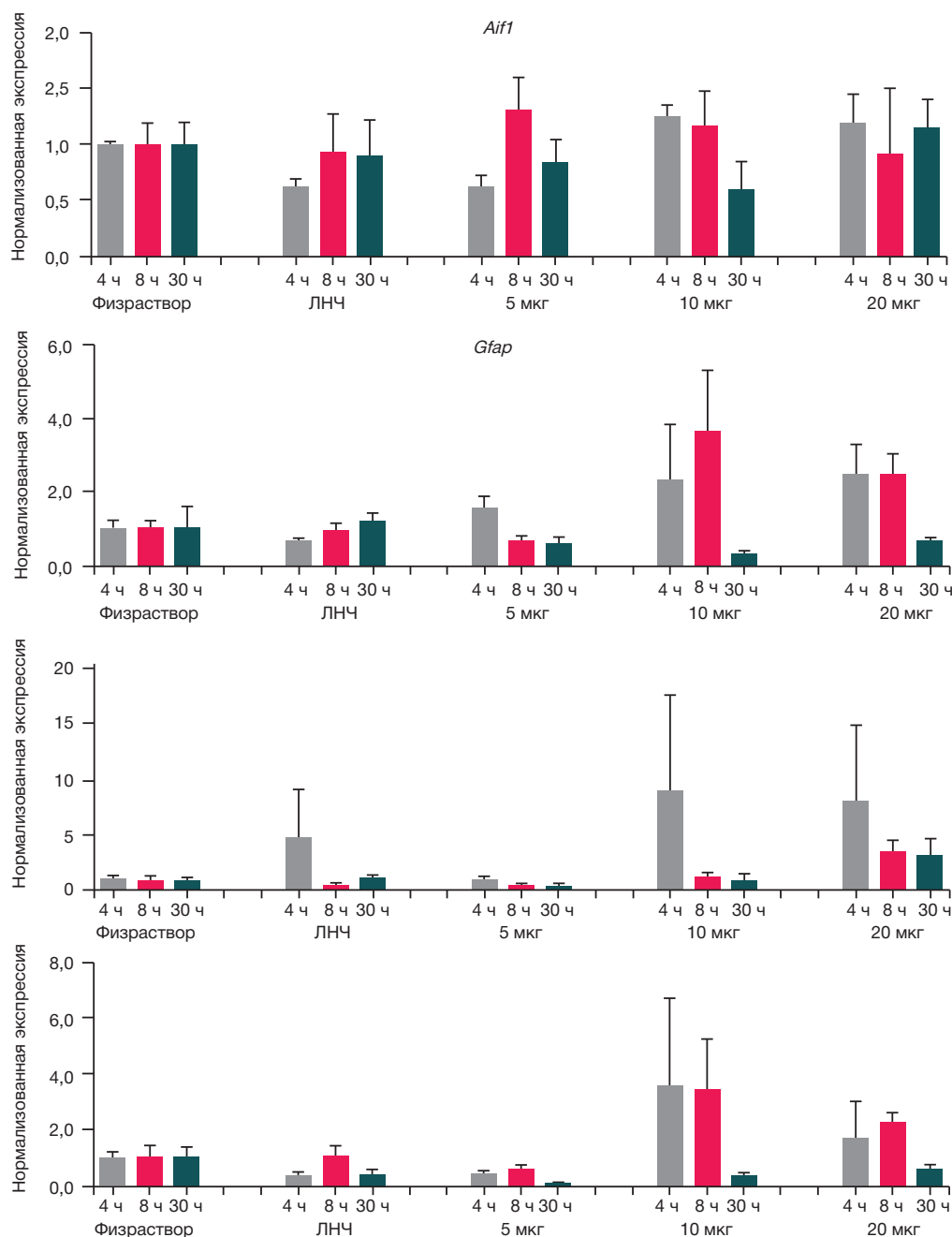


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*Il1β*, *Tnfa*) и маркеров активации глии (*Aif1*, *Gfap*) в префронтальной коре в различных временных точках после введения мРНК-ЛНЧ-вакцины

Экспрессию оценивали относительно мРНК гена домашнего хозяйства (*Gapdh*). Для постановки ПЦР использовали набор «БиоМастер HS-qPCR 2x» («Биолабмикс»; Россия) на амплификаторе Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories; США) по протоколу: 95 °C в течение 15 с, 60 °C — 20 с. Для каждого образца кДНК все определения проводили в трех технических повторях. Для анализа количественной экспрессии был применен метод  $\Delta\Delta Ct$ .

#### Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью дисперсионного анализа ANOVA (в качестве факторов были использованы «группа» и «время после введения») и Fisher's LSD в качестве post hoc анализа. Различия между экспериментальными группами считали статистически

значимыми при  $p < 0,05$ , на уровне тенденции — при  $p < 0,1$ . Анализ данных производили с помощью пакета программ Statistica 8.0 (Statsoft Inc.; США).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные результаты демонстрируют, что различные дозы мРНК-ЛНЧ вакцин индуцируют активацию экспрессии *Aif1* в гипоталамусе (рис. 2), но не в префронтальной коре (рис. 3). Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA позволил выявить достоверное влияние факторов «группа» и «время после введения» на экспрессию *Aif1* в гипоталамусе ( $F(4,70) = 2,866$  при  $p = 0,032$ ;  $F(2,72) = 4,246$  при  $p = 0,019$ ). У групп мышей с введением 10 мкг мРНК и 20 мкг РНК в составе мРНК-ЛНЧ-вакцины экспрессия мРНК *Aif1* была выше примерно на 80% через 8 ч после введения вакцины, чем у контрольной группы с введением

фосфатного буфера ( $p > 0,05$ ). Интересно, что в группах с введением 5 мкг РНК в составе мРНК-ЛНЧ-вакцин и с пустыми ЛНЧ (без мРНК) также выявлено повышение экспрессии *Aif1* (на 40–55%) через 8 ч, однако эти различия были статистически недостоверны. Через 30 ч после введения вакцин различий в экспрессии *Aif1* гипоталамусе между животными разных групп не наблюдалось. Достоверного влияния фактора «группа» или взаимодействия факторов «группа» и «время после введения» не обнаружено ни на экспрессию других оцененных генов в гипоталамусе (*Tnfa*, *Il1 $\beta$* , *Gfap*), ни на экспрессию генов в префронтальной коре. Таким образом, мы наблюдали умеренное влияние мРНК-ЛНЧ на нейровоспаление, связанное с повышенной экспрессией маркеров активной микроглии в гипоталамусе, но не во фронтальной коре, и это влияние было дозозависимым.

Сравнение экспрессии генов в различных временных точках у животных разных групп после введения мРНК-ЛНЧ-вакцины показало, что экспрессия *Il1 $\beta$*  была сильно повышена через 4 ч после вакцинации как в гипоталамусе, так и в префронтальной коре у некоторых животных из групп с введением 10 мкг мРНК и 20 мкг РНК в составе мРНК-ЛНЧ-вакцины, но в более поздних точках измерений эти эффекты не наблюдались. Несмотря на выраженные эффекты на *Il1 $\beta$* , эти различия не были статистически достоверными, поскольку лишь некоторые животные из групп имели выраженный ответ. Такие результаты свидетельствуют о гетерогенности ответа на мРНК-ЛНЧ-вакцину в зависимости от индивидуальных особенностей животных.

Мы нашли влияние фактора «время после введения» на экспрессию *Gfap* и *Tnfa* в гипоталамусе ( $F(2,72) = 10,179$  при  $p < 0,0001$ ;  $F(2,72) = 5,181$  при  $p = 0,008$ ). Экспрессия *Gfap* снижалась через 8 ч во всех экспериментальных группах, в то же время усиливалась через 30 ч. Интересно, что у большинства экспериментальных групп экспрессия *Tnfa* тоже усиливалась через 30 ч после вакцинации, по сравнению с уровнем, который наблюдали через 4 ч. Эти результаты позволяют предположить, что у мышей из экспериментальных групп развивается вторая волна провоспалительной активации, в которую вовлечены клетки астроглии и интерлейкин TNF $\alpha$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показали, что мРНК-ЛНЧ вакцины в дозе 10–20 мкг мРНК способны усиливать уровень экспрессии *Aif1* через 8 ч после вакцинации в гипоталамусе, но не в префронтальной коре. Мы обнаружили, что экспрессия *Gfap*, *Il1 $\beta$* , *Tnfa* в экспериментальных группах демонстрировала различия в уровне экспрессии в различных временных точках в гипоталамусе, что также является косвенным свидетельством того, что уровень экспрессии этих генов может коррелировать с фактом введения мРНК-ЛНЧ вакцин.

мРНК-ЛНЧ-вакцины способна вызвать как местное, так и системное воспаление [4, 8]. Воспаление может быть вызвано различными компонентами вакцины: молекулами мРНК, липидами, входящими в состав ЛНЧ, или белковым продуктом, кодируемым мРНК. мРНК-ЛНЧ в основном трансфецируют клетки вблизи места инъекции, после чего ЛНЧ быстро транспортируются в проксимальные лимфатические узлы путем пассивного дренирования, а также активно переносятся профессиональными антигенпрезентирующими клетками и нейтрофилами

[10, 11]. Затем мРНК-ЛНЧ через системный кровоток могут достичь любой клетки организма и в низких количествах обнаруживаются в головном мозге, что свидетельствует о ее способности преодолевать гематоэнцефалический барьер [12, 13].

Известно, что периферические воспалительные стимулы также могут вызывать иммунологический ответ в головном мозге, который приводит к активации клеток микроглии, являющихся основными иммунокомпетентными клетками головного мозга [14]. Благодаря своей цитокиносинтезирующей и фагоцитирующей активности они влияют на развитие и созревание структур ЦНС [15], участвуют в нормальном становлении и созревании нейронных цепей во время развития [16], поддерживают пул нейрональных клеток, опосредуют созревание и редукцию синапсов, регулируя количество синапсов и экспрессию рецепторов [17].

Таким образом, найденные нами признаки активации микроглии в некоторых экспериментальных группах могут быть как свидетельством прямого прохождения мРНК-ЛНЧ через гематоэнцефалический барьер и запуска процессов нейровоспаления, так и следствием усиления периферического воспаления. Поскольку в нашем исследовании мы не оценивали параметры периферической иммунной активации, мы не можем однозначно ответить на этот вопрос.

Получение достоверных различий по экспрессии *Aif1* через 8 ч после иммунизации согласуется с данными, которые демонстрируют, что пик активации микроглии приходится на период 6–24 ч после индукции воспаления [14, 18–20]. В то же время пик активации цитокинов после индукции воспалительными агентами, такими как бактериальный липополисахарид или синтетический аналог двухцепочечной РНК (Poly I:C), приходится на 1,5–3,0 после введения воспалительных миметиков [20]. Поэтому отсутствие значимых эффектов на экспрессию *Il1 $\beta$*  и *Tnfa* между группами может быть связано с тем, что пик активации экспрессии этих генов уже пройден. В то же время ряд исследований демонстрирует, что повышенный уровень цитокинов на периферии и в головном мозге может сохраняться до 24 ч после индукции воспаления миметиками [18, 21].

В нашей работе мы оценивали экспрессию провоспалительных генов в двух структурах головного мозга. В гипоталамусе отмечены значительно более выраженные эффекты, в то время как в префронтальной коре никаких значимых изменений найдено не было. Гипоталамус является важной структурой мозга, которая функционирует как метаболический центр, регулирующий многие фундаментальные физиологические процессы, участвующие в метаболизме всего тела, включая восприятие питательных веществ, контроль аппетита, расход энергии; таким образом, гипоталамус играет решающую роль в системной гомеостатической регуляции [22]. Клинические данные показали, что различные стимулы, такие как периферическое воспаление или увеличение количества потребления насыщенных жирных кислот, могут привести к нейровоспалению в этой структуре мозга [23–25]. Кроме того, в гипоталамусе присутствуют различные популяции микроглиальных и астроглиальных клеточных популяций [26]. В совокупности эти данные свидетельствуют, что гипоталамус может являться своеобразным сенсором периферического воспаления и реагировать на провоспалительные сигналы более реактивно, чем префронтальная кора.



## ВЫВОДЫ

мРНК-ЛНЧ-вакцина способна активировать экспрессию *Aif1* в гипоталамусе через 8 ч после вакцинации дозозависимым образом. В то же время в префронтальной коре значимого влияния мРНК-ЛНЧ-вакцин на экспрессию генов найдено не было. Несмотря на то что через 30 ч после вакцинации изменения в экспрессии *Aif1* были не значимы, эти результаты показывают, что мРНК-ЛНЧ-вакцина может индуцировать

нейровоспаление. Для понимания механизмов, за счет которых мРНК-ЛНЧ-вакцина стимулирует воспаление, необходимы дополнительные эксперименты на расширенных группах животных с оценкой параметров периферического воспаления и более широким спектром анализа нейровоспаления с привлечением иммуоферментных и иммуногистохимических методов для оценки провоспалительных агентов и морфологии микроглиальных клеток в гипоталамусе и других мозговых структурах.

## Литература

1. Baden LR, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med.* 2021; 384 (5): 403–16.
2. Polack FP, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 2020; 383 (27): 2603–15.
3. Kon E, Elia U, Peer D. Principles for designing an optimal mRNA lipid nanoparticle vaccine. *Curr Opin Biotechnol.* 2022; 73: 329–36.
4. Ndeupen S, et al. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience.* 2021; 24 (12): 103479.
5. Parhiz H. et al. Added to pre-existing inflammation, mRNA-lipid nanoparticles induce inflammation exacerbation (IE). *J Control Release.* 2022; 344: 50–61.
6. Mu X, Hur S. Immunogenicity of In Vitro-Transcribed RNA. *Acc Chem Res.* 2021; 54 (21): 4012–23.
7. Heil F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 2004; 303 (5663): 1526–9.
8. Trougakos IP, et al. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis. *Trends Mol Med.* 2022; 28 (7): 542–54.
9. Reshetnikov VV, et al. Social defeat stress in adult mice causes alterations in gene expression, alternative splicing, and the epigenetic landscape of H3K4me3 in the prefrontal cortex: An impact of early-life stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2021; 106: 110068.
10. Bahl K, et al. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. *Mol Ther.* 2017; 25 (6): 1316–27.
11. Liang F, et al. Efficient Targeting and Activation of Antigen-Presenting Cells In Vivo after Modified mRNA Vaccine Administration in Rhesus Macaques. *Mol Ther.* 2017; 25 (12): 2635–47.
12. Maugeri M, et al. Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 4333.
13. Pardi N, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release.* 2015; 217: 345–1.
14. Hoogland IC, et al. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation.* 2015; 12: 114.
15. Bilimoria PM, Stevens B. Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Res.* 2015; 1617: 7–17.
16. Chen Z, et al. Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun.* 2014; 5: 4486.
17. Ji K, et al. Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PLoS One.* 2013; 8 (2): e56293.
18. Biesmans S, et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 271359.
19. Buttini M, Limonta S, Boddeke HW. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain. *Neurochem Int.* 1996; 29 (1): 25–35.
20. Mutovina A, et al. Unique Features of the Immune Response in BTBR Mice. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (24).
21. Cunningham C, et al. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain Behav Immun.* 2007; 21 (4): 490–502.
22. Goldstein DS, Kopin IJ. Homeostatic systems, biocybernetics, and autonomic neuroscience. *Auton Neurosci.* 2017; 208: 15–28.
23. Burfeind KG, Michaelis KA, Marks DL. The central role of hypothalamic inflammation in the acute illness response and cachexia. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 54: 42–52.
24. Rahman MH, et al. Hypothalamic inflammation and malfunctioning glia in the pathophysiology of obesity and diabetes: Translational significance. *Biochem Pharmacol.* 2018; 153: 123–33.
25. de Git KC, Adan RA. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obes Rev.* 2015; 16 (3): 207–24.
26. Mendes NF, et al. Hypothalamic Microglial Heterogeneity and Signature under High Fat Diet-Induced Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (5).
8. Trougakos IP, et al. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis. *Trends Mol Med.* 2022; 28 (7): 542–54.
9. Reshetnikov VV, et al. Social defeat stress in adult mice causes alterations in gene expression, alternative splicing, and the epigenetic landscape of H3K4me3 in the prefrontal cortex: An impact of early-life stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2021; 106: 110068.
10. Bahl K, et al. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. *Mol Ther.* 2017; 25 (6): 1316–27.
11. Liang F, et al. Efficient Targeting and Activation of Antigen-Presenting Cells In Vivo after Modified mRNA Vaccine Administration in Rhesus Macaques. *Mol Ther.* 2017; 25 (12): 2635–47.
12. Maugeri M, et al. Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells. *Nat*

- Commun. 2019; 10 (1): 4333.
13. Pardi N, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release*. 2015; 217: 345–1.
14. Hoogland IC, et al. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation*. 2015; 12: 114.
15. Bilimoria PM, Stevens B. Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Res*. 2015; 1617: 7–17.
16. Chen Z, et al. Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun*. 2014; 5: 4486.
17. Ji K, et al. Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PLoS One*. 2013; 8 (2): e56293.
18. Biesmans S, et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 271359.
19. Buttini M, Limonta S, Boddeke HW. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain. *Neurochem Int*. 1996; 29 (1): 25–35.
20. Mutovina A, et al. Unique Features of the Immune Response in BTBR Mice. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (24).
21. Cunningham C, et al. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain Behav Immun*. 2007; 21 (4): 490–502.
22. Goldstein DS, Kopin IJ. Homeostatic systems, biocybernetics, and autonomic neuroscience. *Auton Neurosci*. 2017; 208: 15–28.
23. Burfeind KG, Michaelis KA, Marks DL. The central role of hypothalamic inflammation in the acute illness response and cachexia. *Semin Cell Dev Biol*. 2016; 54: 42–52.
24. Rahman MH, et al. Hypothalamic inflammation and malfunctioning glia in the pathophysiology of obesity and diabetes: Translational significance. *Biochem Pharmacol*. 2018; 153: 123–33.
25. de Git KC, Adan RA. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obes Rev*. 2015; 16 (3): 207–24.
26. Mendes NF, et al. Hypothalamic Microglial Heterogeneity and Signature under High Fat Diet-Induced Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (5).

## СТРАТЕГИИ ДИЗАЙНА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

С. С. Терехов<sup>1</sup>, В. И. Шмыгareв<sup>1</sup>, К. В. Пуртов<sup>2</sup>, И. В. Смирнов<sup>1</sup>, И. В. Ямпольский<sup>1,3</sup>, А. С. Царькова<sup>1,3</sup> ✉<sup>1</sup> Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия<sup>2</sup> Институт биофизики, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия<sup>3</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Возрастающие с каждым годом численность и плотность человеческой популяции приводит к увеличивающемуся риску распространения инфекционных заболеваний, что грозит возникновением все новых эпидемий по всему миру. Широкое использование вакцинации снизило заболеваемость и смертность, связанные с вирусными инфекциями, а в некоторых случаях полностью уничтожило вирус среди населения. К сожалению, некоторые виды вирусов сохраняют способность к быстрой мутации и таким образом ускользают от вызванного вакциной иммунного ответа. В связи с этим для лечения и профилактики вирусных заболеваний требуются новые противовирусные препараты. Современные исследования в области структур и свойств вирусных протеаз, имеющих ключевое значение в жизненном цикле вирусов, позволяют, на наш взгляд, превратить эти ферменты в перспективные мишени для разработки эффективных методов борьбы с вирусными заболеваниями.

**Ключевые слова:** противовирусные препараты, вирусные протеазы, ингибиторы протеаз, дизайн пролекарств**Финансирование:** работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2021-1049.**Вклад авторов:** С. С. Терехов, В. И. Шмыгareв, К. В. Пуртов — анализ литературы; И. В. Ямпольский, И. В. Смирнов — анализ литературы, общее руководство проектом; А. С. Царькова — анализ литературы, обработка данных, руководство проектом, написание статьи.✉ **Для корреспонденции:** Александра Сергеевна Царькова  
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997, Россия; [altsarkova@gmail.com](mailto:altsarkova@gmail.com)**Статья получена:** 05.12.2022 **Статья принята к печати:** 19.12.2022 **Опубликована онлайн:** 28.12.2022**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.067

## DRUG DESIGN STRATEGIES FOR THE TREATMENT OF CORONAVIRUS INFECTION

Terekhov SS<sup>1</sup>, Shmygarev VI<sup>1</sup>, Purtov KV<sup>2</sup>, Smirnov IV<sup>1</sup>, Yampolsky IV<sup>1,3</sup>, Tsarkova AS<sup>1,3</sup> ✉<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia<sup>2</sup> Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Krasnoyarsk, Russia<sup>3</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The increasing size and density of the human population is leading to an increasing risk of infectious diseases that threaten to spread yet another pandemics. The widespread use of vaccination has reduced morbidity and mortality associated with viral infections and in some cases eradicated the virus from the population entirely. Regrettably, some virus species retain the ability to mutate rapidly and thus evade the vaccine-induced immune response. New antiviral drugs are therefore needed for the treatment and prevention of viral diseases. Modern research into the structures and properties of viral proteases, which are of key importance in the life cycle of viruses, makes it possible, in our opinion, to turn these enzymes into promising targets for the development of effective viral disease control methods.

**Keywords:** antiviral drugs, viral proteases, protease inhibitors, prodrug design**Funding:** This work was financially supported by grant № 075-15-2021-1049 from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.**Author contribution:** S.S. Terekhov, V.I. Shmygarev, K.V. Purtov — literature analysis; I.V. Yampolsky, I.V. Smirnov — literature analysis, general project management; A.S. Tsarkova — literature analysis, data processing, project management, article writing.✉ **Correspondence should be addressed:** Aleksandra Sergeyevna Tsarkova  
Miklukho-Maklay, 16/10, Moscow, 117997, Russia; [altsarkova@gmail.com](mailto:altsarkova@gmail.com)**Received:** 05.12.2022 **Accepted:** 19.12.2022 **Published online:** 28.12.2022**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.067

Наряду с сердечно-сосудистыми и цереброваскулярными заболеваниями, инфекционные болезни, вызванные бактериями, вирусами, паразитами и грибами, являются основной причиной смертности во всем мире [1]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, глобальное распространение коронавирусной инфекции, начавшейся в 2019 г. в Китае, привело к заражению более 600 млн и гибели более 6,5 миллионов человек за три года [2]. Причиной пандемии COVID-19 стал новый коронавирус SARS-CoV-2. Ранее представители семейства коронавирусов SARS-CoV и MERS-CoV вызвали вспышки тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) в 2002 г. и ближневосточного респираторного синдрома (MERS) в 2012 г. [3].

Несколько десятилетий изучения семейства коронавирусов показали, что геном вирусной РНК транслируется в два больших полипротеина, pp1a и pp1ab, которые благодаря своей внутренней пептидазной

активности расщепляются на несколько неструктурных белков (Nsp), необходимых для обеспечения транскрипции и репликации вирусного генома [4]. Для протеолитической деградации полипротеинов критичны два фермента — цистеиновые папаин-подобная пептидаза (PLP) [5] и химотрипсин-подобная пептидаза (3CL), известная также как основная протеаза коронавируса (M<sup>Pro</sup>) [6]. Пептидаза M<sup>Pro</sup> состоит из трех доменов: домены I и II образуют химотрипсин-подобный фолдинг, содержащий сайт связывания субстрата, расположенный в щели между двумя доменами, а домен III обеспечивает образование гомодимера и играет ключевую роль в каталитической активности протеазы, так как мономер M<sup>Pro</sup> неактивен [7]. M<sup>Pro</sup> различных коронавирусов имеют общие высококонсервативные сайты связывания субстрата, распознающие аминокислотную последовательность полипротеина (Leu-Gln)↓(Ser/Ala/Gly), где гидролизуется пептидная связь после остатка глутамина [7, 8].

Разработка ингибиторов цистеиновых протеаз, участвующих в репликации коронавирусов (CoV), представляет собой эффективную стратегию борьбы с COVID-19 и другими заболеваниями, вызванными коронавирусами. Перспективной мишенью для разработки противовирусных препаратов, направленных против SARS-CoV-2 и других CoV, является M<sup>Pro</sup> из-за ее важной роли в посттрансляционном процессинге полипротеинов. Более того, отсутствие протеазы человека, расщепляющей белки после остатка Gln, является одним из преимуществ M<sup>Pro</sup> как мишени для разработки ингибиторов, поскольку повышает их специфичность и ограничивает нежелательные побочные эффекты. После вспышек эпидемий, вызванных CoV в 2002 и 2012 г., было предложено множество ингибиторов M<sup>Pro</sup> [9], однако лишь в 2021 г. появились первые лекарственные кандидаты, успешно прошедшие клинические испытания [10, 11].

Другой интересной стратегией разработки противовирусных лекарственных препаратов можно назвать использование протеолиза для активации пролекарств [12]. Пролекарства представляют собой инактивированные производные молекул лекарственных средств, которые могут подвергаться трансформации

ферментами с высвобождением активного действующего вещества *in vivo* [12]. Ряд пролекарств, активируемых протеазами (ПАП), был разработан и успешно использован в борьбе с раковыми заболеваниями для улучшения доставки лекарств к злокачественным новообразованиям, где экспрессия протеаз выше, чем в здоровых тканях [13]. Однако применение ПАП не ограничено разработкой противоопухолевых препаратов, последние публикации показывают, что данный подход можно применять и для лечения бактериальных и вирусных инфекций [14, 15].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комбинирование двух стратегий может стать перспективным направлением в разработке препаратов для лечения COVID-19. Использование инактивированных цитотоксических и цитостатических препаратов, конъюгированных как с необратимыми, так и с обратимыми селективными ингибиторами протеазы M<sup>Pro</sup>, способно обеспечить специфичность доставки и высвобождения действующего вещества в зараженных клетках и снизить общую токсичность разработанных лекарственных препаратов.

## Литература

1. The top 10 causes of death, Geneva: World Health Organization c2022 [cited 2022 Nov 30]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
2. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, Geneva: World Health Organization c2022 [cited 2022 Nov 30]. Available from: <https://covid19.who.int/>.
3. Zhou H, Yang J, Zhou C, Chen B, Fang H, Chen S, et al. A Review of SARS-CoV2: Compared With SARS-CoV and MERS-CoV. *Front Med.* 2021; 8: 628370.
4. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2015; 1282: 1–23.
5. Báez-Santos YM, St. John SE, Mesecar AD. The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. *Antiviral Res.* 2015; 115: 21–38.
6. Wang F, Chen C, Tan W, Yang K, Yang H. Structure of Main Protease from Human Coronavirus NL63: Insights for Wide Spectrum Anti-Coronavirus Drug Design. *Sci Rep.* 2016; 6: 22677.
7. Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, et al. Structure of M<sup>pro</sup> from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature.* 2020; 582: 289–93.
8. Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved  $\alpha$ -ketoamide inhibitors. *Science.* 2020;

368 (6489): 409–12.

9. Liu Y, Liang C, Xin L, Ren X, Tian L, Ju X, et al. The development of Coronavirus 3C-Like protease (3CLpro) inhibitors from 2010 to 2020. *Eur J Med Chem.* 2020; 206: 112711.
10. Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, Aschenbrenner L, Avery M, Beritt S, et al. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science.* 2021; 374 (6575): 1586–93.
11. de Vries M, Mohamed AS, Prescott RA, Valero-Jimenez AM, Desvignes L, O'Connor R, et al. A comparative analysis of SARS-CoV-2 antivirals characterizes 3CLpro inhibitor PF-00835231 as a potential new treatment for COVID-19. *J Virol.* 2021; 95 (10): e01819–20.
12. Poreba M. Protease-activated prodrugs: strategies, challenges, and future directions. *FEBS J.* 2020; 287 (10): 1936–69.
13. Choi KY, Swierczewska M, Lee S, Chen X. Protease-activated drug development. *Theranostics.* 2012; 2 (2): 156–78.
14. Richter M, Leuthold MM, Graf D, Bartenschlager R, Klein CD. Prodrug activation by a viral protease: evaluating combretastatin peptide hybrids to selectively target infected cells. *ACS Med Chem Lett.* 2019; 10: 1115–21.
15. Boyce JH, Dang B, Ary B, Edmondson Q, Craik CS, Degrado WF, et al. Platform to Discover Protease-Activated Antibiotics and Application to Siderophore-Antibiotic Conjugates. *J Am Chem Soc.* 2020; 142 (51): 21310.

## References

1. The top 10 causes of death, Geneva: World Health Organization c2022 [cited 2022 Nov 30]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
2. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, Geneva: World Health Organization c2022 [cited 2022 Nov 30]. Available from: <https://covid19.who.int/>.
3. Zhou H, Yang J, Zhou C, Chen B, Fang H, Chen S, et al. A Review of SARS-CoV2: Compared With SARS-CoV and MERS-CoV. *Front Med.* 2021; 8: 628370.
4. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2015; 1282: 1–23.
5. Báez-Santos YM, St. John SE, Mesecar AD. The SARS-

coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. *Antiviral Res.* 2015; 115: 21–38.

6. Wang F, Chen C, Tan W, Yang K, Yang H. Structure of Main Protease from Human Coronavirus NL63: Insights for Wide Spectrum Anti-Coronavirus Drug Design. *Sci Rep.* 2016; 6: 22677.
7. Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, et al. Structure of M<sup>pro</sup> from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature.* 2020; 582: 289–93.
8. Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis



- for design of improved  $\alpha$ -ketoamide inhibitors. *Science*. 2020; 368 (6489): 409–12.
9. Liu Y, Liang C, Xin L, Ren X, Tian L, Ju X, et al. The development of Coronavirus 3C-Like protease (3CLpro) inhibitors from 2010 to 2020. *Eur J Med Chem*. 2020; 206: 112711.
  10. Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, Aschenbrenner L, Avery M, Berritt S, et al. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science*. 2021; 374 (6575): 1586–93.
  11. de Vries M, Mohamed AS, Prescott RA, Valero-Jimenez AM, Desvignes L, O'Connor R, et al. A comparative analysis of SARS-CoV-2 antivirals characterizes 3CLpro inhibitor PF-00835231 as a potential new treatment for COVID-19. *J Virol*. 2021; 95 (10): e01819–20.
  12. Poreba M. Protease-activated prodrugs: strategies, challenges, and future directions. *FEBS J*. 2020; 287 (10): 1936–69.
  13. Choi KY, Swierczewska M, Lee S, Chen X. Protease-activated drug development. *Theranostics*. 2012; 2 (2): 156–78.
  14. Richter M, Leuthold MM, Graf D, Bartenschlager R, Klein CD. Prodrug activation by a viral protease: evaluating combretastatin peptide hybrids to selectively target infected cells. *ACS Med Chem Lett*. 2019; 10: 1115–21.
  15. Boyce JH, Dang B, Ary B, Edmondson Q, Craik CS, Degradó WF, et al. Platform to Discover Protease-Activated Antibiotics and Application to Siderophore–Antibiotic Conjugates. *J Am Chem Soc*. 2020; 142 (51): 21310.