

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. Божено, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)
Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)
Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)
Г. Е. Гендлин, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)
Л. Р. Горбачева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
И. Г. Гордеев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)
Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Т. В. Зарубина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Е. Каган, профессор (Питтсбург, США)
Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)
Б. А. Кобринский, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Козлов, MD PhD (Вена, Австрия)
Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)
М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)
Н. Е. Мантурова, д. м. н. (Москва, Россия)
О. Ю. Милушкина, д. м. н., доцент (Москва, Россия)
З. Б. Митупов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)
Ю. П. Пивоваров, д. м. н., академик РАН, профессор (Москва, Россия)
Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. Ю. Разумовский, член-корр., профессор (Москва, Россия)
О. Ю. Реброва, д. м. н. (Москва, Россия)
А. С. Рудой, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
А. К. Рылова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
Н. А. Скоблина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. М. Смирнов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
А. Спаллоне, д. м. н., профессор (Рим, Италия)
В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)
С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Х. П. Тахчиди, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Л. Филипенко, к. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)
М. А. Чундокова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Л. Н. Шишкина, д. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

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

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru

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

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2022: 0,5

Журнал включен в WoS. JCR 2021: 0,5

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

Scopus®

WEB OF SCIENCE™

Google
scholar

Scimago Journal & Country Rank 2020: 0,14

Журнал включен в Перечень 31.01.2020 (№ 507)

Здесь находится открытый архив журнала

SJR
Scimago Journal & Country Rank



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2023-01

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

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

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



Подписано в печать 28.02.2023
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии PrintFormula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc, professor

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

EDITORS Valentina Geidebrekht, 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)
Kzyzhkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)
Kobriniskii BA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Kozlov AV, MD PhD, (Vienna, Austria)
Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)
Lebedev MA, PhD (Darem, USA)
Manturova NE, DSc (Moscow, Russia)
Milushkina OYu, DSc, professor (Moscow, Russia)
Mitupov ZB, DSc, professor (Moscow, Russia)
Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)
Pivovarov YuP, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Razumovskii AYU, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Rebrova OYu, DSc (Moscow, Russia)
Rudoy AS, DSc, professor (Minsk, Belarus)
Rylova AK, DSc, professor (Moscow, Russia)
Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Skoblina NA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Smirnov VM, DSc, professor (Moscow, Russia)
Spallone A, DSc, professor (Rome, Italy)
Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)
Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Takhchidi KhP, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)
Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)
Khazipov RN, DSc (Marsel, France)
Chundukova MA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Shimanovskii NL, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)
Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2022: 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.2023-01

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

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

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



Approved for print 28.02.2023
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

4

Разработка и характеристика векторной системы на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа

Т. А. Ожаровская, О. Попова, О. В. Зубкова, И. В. Вавилова, А. А. Почтовый, Д. В. Щебляков, В. А. Гушчин, Д. Ю. Логунов, А. Л. Гинцбург

Development and characterization of a vector system based on the simian adenovirus type 25

Ozharovskaya TA, Popova O, Zubkova OV, Vavilova IV, Pochtovyi AA, Shcheblyakov DV, Gushchin VA, Logunov DYU, Gintsburg AL

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

12

Однодоменное антитело для связывания консервативного эпитопа рецептор-связывающего домена белка Spike коронавируса SARS-COV-2

П. О. Воробьев, С. В. Тиллиб

Single-domain antibody for binding the conserved epitope in the SARS-COV-2 spike protein receptor-binding domain

Vorobyev PO, Tilib SV

МЕТОД

22

Подход к кластеризации пациентов по микрочиповым данным внутри отдельных локусов с использованием комбинаций вариантов

Л. Н. Юльметова, Н. А. Кулемин, Е. И. Шарова

The approach to patient clustering based on the microchip data confined to distinct loci using the combinations of variants

Iulmetova LN, Kulemin NA, Sharova EI

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

32

Выживаемость клеток человека в биомедицинских клеточных продуктах при хранении при комнатной температуре

О. С. Роговая, Е. В. Алпеева, Е. С. Ручко, А. В. Еремеев, Е. А. Воротеляк

Survival of human cells in tissue-engineered constructs stored at room temperature

Rogovaya OS, Alpeeva EV, Ruchko ES, Ereemeev AV, Vorotelyak EA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

41

Исследование влияния микродиссекции блестящей оболочки эмбрионов млекопитающих на ее толщину

Д. С. Ситников, И. В. Ильина, М. А. Филатов, Ю. Ю. Силаева

Assessment of the zona pellucida microdissection on its thickness in mammalian embryos

Sitnikov DS, Ilina IV, Filatov MA, Silaeva YuYu

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

49

Адипокины и миокины как индикаторы фенотипов ожирения и их связь с показателями разнообразия микробиома кишечника

А. В. Шестопалов, Л. А. Ганенко, Т. В. Григорьева, А. В. Лайков, И. Ю. Васильев, И. М. Колесникова, Ю. Л. Набока, Н. И. Волкова, С. А. Румянцев

Adipokines and myokines as indicators of obese phenotypes and their association with the gut microbiome diversity indices

Shestopalov AV, Ganenko LA, Grigoryeva TV, Laikov AV, Vasilyev IYu, Kolesnikova IM, Naboka YuL, Volkova NI, Roumiantsev SA

МНЕНИЕ

59

Основные меры государственной промышленной политики в фармацевтической отрасли Российской Федерации

Т. Ю. Гайдин, Е. В. Геллер, С. А. Рожнова, Т. А. Гайдина

Main state industrial policy measures for the pharmaceutical industry of the Russian Federation

TY Gaydin, EV Geller, SA Rozhnova, TA Gaydina

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

63

Среднесрочные результаты лечения тяжелой деформации переднего отдела стопы у пациентов пожилого возраста

К. А. Егизарян, А. П. Ратьев, Е. А. Мирошникова, Е. А. Жаворонков, А. С. Абилемет

Midterm severe forefoot deformity treatment outcomes in elderly patients

Egiazaryan KA, Ratyev AP, Miroshnikova EA, Zhavoronkov EA, Abilemets AS

РАЗРАБОТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕКТОРНОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСА ОБЕЗЬЯН 25-ГО СЕРОТИПА

Т. А. Ожаровская , О. Попова, О. В. Зубкова, И. В. Вавилова, А. А. Почтовый, Д. В. Щебляков, В. А. Гущин, Д. Ю. Логунов, А. Л. Гинцбург

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

В настоящее время аденовирусные векторы широко используют в качестве вакцинных и генотерапевтических препаратов благодаря их технологичности и способности индуцировать стойкий гуморальный и клеточный иммунный ответ. Однако одни из наиболее часто используемых векторов для разработки кандидатных вакцин — рекомбинантные аденовирусы человека 5-го и 26-го серотипов (Ad5 и Ad26) становятся менее привлекательными из-за высокого процента населения с иммунитетом к данным векторам, вызванным вакцинацией «Спутником V». На сегодняшний день появляется тенденция к выбору альтернативных серотипов аденовирусов в качестве платформ для разработки вакцин против новых патогенов. Например, аденовирус обезьян 25-го серотипа (SAd25), принадлежащий к подгруппе E, генетически отдален от Ad5 и проявляет крайне низкую серопревалентность у людей, что делает его привлекательным альтернативным вакцинным вектором. Целью работы было создать и исследовать новую вакцинную платформу на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа. Для конструирования и получения рекомбинантных аденовирусов использовали современные молекулярно-биологические и вирусологические методы, для филогенетического анализа применяли биоинформатические методы. Полученный рекомбинантный аденовирусный вектор способен эффективно реплицироваться в производственной культуре клеток HEK293 (клетки почки эмбриона человека). Результаты работы обосновывают целесообразность дальнейшего исследования вектора SAd25 в качестве платформы для разработки вакцин для профилактики различных инфекционных заболеваний.


Ключевые слова: аденовирусный вектор, вакцинная платформа, рекомбинантный аденовирус, аденовирус обезьян 25-го серотипа

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка технологической платформы для создания рекомбинантных, в том числе живых вакцин для профилактики инфекционных болезней».

Благодарности: выражаем искреннюю благодарность научному сотруднику А. Э. Никоновой из лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» за помощь в проведении филогенетического анализа последовательностей гексонов аденовирусов, а также лаборанту-исследователю Д. Д. Кустовой за помощь в получении полногеномных последовательностей.

Вклад авторов: Т. А. Ожаровская, О. В. Зубкова, Д. Ю. Логунов, А. Л. Гинцбург — концепция и план экспериментов; О. Попова, О. В. Зубкова — получение генно-инженерных конструкций и рекомбинантного аденовируса обезьян 25-го серотипа; Т. А. Ожаровская, И. В. Вавилова — филогенетический анализ, вирусологические эксперименты; А. А. Почтовый — полногеномное секвенирование аденовирусов; Т. А. Ожаровская, О. В. Зубкова — подготовка и написание статьи, интерпретация результатов; Д. В. Щебляков, В. А. Гущин — редактирование рукописи; В. А. Гущин — руководство проектом госзадания.

Соблюдение этических стандартов: работа проведена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.

 **Для корреспонденции:** Татьяна Андреевна Ожаровская
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098, Россия; t.ozh@yandex.ru

Статья получена: 29.12.2022 **Статья принята к печати:** 20.01.2023 **Опубликована онлайн:** 28.02.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.006

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF A VECTOR SYSTEM BASED ON THE SIMIAN ADENOVIRUS TYPE 25

Ozharovskaia TA , Popova O, Zubkova OV, Vavilova IV, Pochtovyi AA, Shcheblyakov DV, Gushchin VA, Logunov DYU, Gintsburg AL

Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Technological versatility and the humoral and cellular immune response induction capacity have conditioned wide spread of adenoviral vectors as vaccine and gene therapy drugs. However, vaccination with Sputnik V made a significant portion of the population immune to the types 5 and 26 (Ad5 and Ad26) recombinant human adenovirus vectors, which are some of the most frequently used bases for candidate vaccines. Today, vaccine designers tend to select alternative adenovirus serotypes as platforms to develop vaccines against new pathogens on. A good example is simian adenovirus type 25 (SAd25), which belongs to subgroup E. It is genetically distant from Ad5 and exhibits extremely low seroprevalence in human beings, which makes it an appealing alternative vaccine vector. The purpose of this work was to design and study a new vaccine platform based on simian adenovirus type 25. We relied on the advanced methods of molecular biology and virology to construct and make recombinant adenoviruses; the phylogenetic analysis in the context of this study was enabled with bioinformatic methods. The resulting recombinant adenoviral vector can effectively replicate itself in the HEK293 cell line (human embryonic kidney cells). This work substantiates the expediency of further investigation into the SAd25 vector as a platform for development of the prevention vaccines against various infectious diseases.


Keywords: adenovirus vector, vaccine platform, recombinant adenovirus, simian adenovirus type 25

Funding: the work is the result of the effort under the "Development of a recombinant vaccines platform (including live vaccines) enabling design of the infectious diseases prevention vaccines" task set by the Ministry of Health of the Russian Federation.

Acknowledgments: we express our sincere gratitude to AE Nikonova, a researcher with the Laboratory of Molecular Biotechnology of the NF Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology for her help in conducting the phylogenetic analysis of adenovirus hexon sequences, as well as to research laboratory assistant D.D. Kustova for her help in obtaining the whole genome sequences.

Author contribution: Ozharovskaia TA, Zubkova OV, Logunov DYU, Gintsburg AL — conceptualization and planning of the experimental part; Popova O, Zubkova OV — production of genetically engineered constructs and recombinant simian adenovirus type 25; Ozharovskaia TA, Vavilova IV — phylogenetic analysis, virological experiments; Pochtovyi AA — whole genome sequencing of adenoviruses; Ozharovskaia TA, Zubkova OV — article preparation and authoring, interpretation of the results; Shcheblyakov DV, Gushchin VA — manuscript editing; Gushchin VA — state assignment project management.

Compliance with ethical standards: the work was carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

 **Correspondence should be addressed:** Tatiana A. Ozharovskaia
Gamalei, 18, Moscow, 123098, Russia; t.ozh@yandex.ru

Received: 29.12.2022 **Accepted:** 20.01.2023 **Published online:** 28.02.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.006

Рекомбинантные аденовирусные векторы (rAd) являются популярным инструментом для доставки генов в клетки млекопитающих, в частности при разработке кандидатных вакцинных препаратов [1–4]. Несмотря на то что вакцины на основе аденовирусов человека 5-го и 26-го серотипов (Ad5 и Ad26 соответственно) против болезни, вызванной вирусом Эбола, и COVID-19 показали свою эффективность [5, 6], существует необходимость в получении новых аденовирусных векторов других серотипов в качестве альтернативы имеющимся. Данная потребность обусловлена формированием у населения поствакцинального иммунитета к аденовирусным векторам, который может влиять на эффективность вакцинации. В связи с этим серотипы других аденовирусов человека, отличные от Ad5 и Ad26, а также серотипы аденовирусов обезьян могут быть использованы для облегчения разработки новых препаратов и гетерологичных схем прайм-буст иммунизации. Существует более 80 серотипов аденовирусов человека, которые по разным данным относят или к семи отдельным подгруппам (A–G), или к семи видам аденовирусов (*Human mastadenovirus A–G*) [7, 8].

Аденовирусы обезьян (SAd) тоже широко исследуют в качестве векторных вакцин. Целый ряд аденовирусных векторов на основе SAd в настоящее время изучают в качестве кандидатных вакцинных препаратов, включая аденовирусы шимпанзе (ChAd) ChAd3 [9], ChAd63 [10, 11], ChAd68 (также называемый SAd25) [12, 13], ChAd83 и ChAd155 [14, 15], а также SAd22 [16], SAd23 [16, 17], SAd24 [16, 18]. Эти векторы показали высокую иммуногенность на животных моделях, а также в клинических исследованиях кандидатных вакцин [13, 19, 20]. Кроме того, они обладают значительным биологическим сходством с аденовирусами человека и низкой перекрестной активностью сывороток с вируснейтрализующими антителами к Ad5 и Ad26 [12, 21].

Один из альтернативных серотипов, используемых в качестве платформы для терапевтического применения, — аденовирус обезьян 25-го серотипа (SAd25). Будучи членом подгруппы E, он может стать привлекательным вектором как при самостоятельном применении, так и в схеме гетерологичной иммунизации. Кроме того, вируснейтрализующие антитела к Ad2, Ad4, Ad5, Ad7 и Ad12 не обладают нейтрализующей активностью по отношению к SAd25, что делает данный вектор многообещающим кандидатом для разработки вакцинной платформы [12].

Целью данной работы было создание новой векторной платформы на основе SAd25 и исследование ее биологических и физических характеристик.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и клеточные линии

В ходе работы использовали лабораторный штамм *Escherichia coli* DH5α (New England Biolabs; США), штамм *E. coli* BJ5183 (Stratagene; США) и клеточную линию HEK293 — клетки почки эмбриона человека, содержащие в геноме E1 область Ad5 («Российская коллекция клеточных линий позвоночных»; Россия). HEK293 культивировали в среде DMEM1× (минимальная среда Игла, модифицированная Дульбекко; HyClone, США) с добавлением 5% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота (HyClone; США) и 25 мл бикарбоната натрия 7,5% («ПанЭко»; Россия), в присутствии 146 мг L-глутамина («ПанЭко»; Россия) и смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина («ПанЭко»; Россия) при 37 °C с 5% CO₂.

Секвенирование генома SAd25

Штамм вируса SAd25 дикого типа (wt-) был получен из Государственной коллекции вирусов II–IV групп патогенности института вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России. Данный вирус был пассирован на клетках HEK293 и очищен методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия (CsCl). Геномную ДНК выделяли из очищенного wt-SAd25 по стандартной методике [22]. Нуклеотидную последовательность wt-SAd25 определяли с помощью полногеномного секвенирования на приборе Oxford MinION (Oxford Nanopore Technologies; Великобритания).

Конструирование рекомбинантных аденовирусных векторов

На первом этапе для создания плазмиды pArms-SAd25-EGFP левое плечо гомологии (нуклеотиды 1–537 и 3406–3801 в соответствии с геномом wt-SAd25) и правое плечо гомологии (нуклеотиды 35969–36519) амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Экспрессионная кассета, состоящая из раннего промотора цитомегаловируса (CMV-промотор), гена зеленого флуоресцентного белка (EGFP) и сигнала полиаденилирования вируса SV40, располагается на месте делеции E1 (нуклеотиды 538–3405). Для дальнейшей линейаризации плазмиды pArms-SAd25-EGFP сайт Swal был вставлен между плечами гомологии.

Для конструирования плазмиды pSAd25ΔE1-EGFP, несущей полноразмерный геном SAd25 и экспрессионную кассету с геном EGFP на месте удаленной E1 области генома, был использован метод гомологичной рекомбинации между линейаризованной плазмидой pArms-SAd25-EGFP и геномной ДНК wt-SAd25 в клетках *E. coli* штамма BJ5183. Трансформацию бактериальных клеток проводили методом электропорации в соответствии с инструкциями производителя на приборе MicroPulser (Bio-Rad, Hercules; США). Полученную плазмиду pSAd25ΔE1-EGFP анализировали с помощью ПЦР и рестрикционного картирования.

Для модификации E3 области была сконструирована плаزمида pBS-E3-SAd25, несущая фрагмент генома SAd25 (12804 нуклеотидов), заклонированный по NheI. Делецию E3-области генома (нуклеотиды 27131–31051) проводили с использованием сайтов для NcoI и SalI и метода гомологичной рекомбинации. Конечная плаزمиды pSAd25-EGFP содержала делеции в E1- и E3-областях генома. Полученный молекулярный клон анализировали с помощью рестрикционного картирования и полногеномного секвенирования.

Получение рекомбинантных аденовирусов

Для получения рекомбинантного аденовируса pSAd25-EGFP использовали плазмиду pSAd25-EGFP. Клетки HEK293 высевали в шестилуночные культуральные планшеты и инкубировали ночь до достижения 80%-й конфлюентности. Для удаления бактериальной части плазмидную ДНК гидролизировали эндонуклеазами рестрикции PacI и SspI и затем трансфицировали в клетки HEK293 с использованием реагента Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific; США) в соответствии с инструкциями производителя. После визуального обнаружения вирусного цитопатического

действия (ЦПД) с помощью инвертированного микроскопа СКХ41 (Olympus; Япония) клетки в культуральной среде подвергали трем циклам замораживания–оттаивания.

Рекомбинантные аденовирусы Ad5-mCherry и Ad26-EGFP были получены как описано ранее [23].

Накопление и очистка рекомбинантных аденовирусов

Рекомбинантные аденовирусы накапливали в культуре клеток линии HEK293. Клетки HEK293 высевали на 10 культуральных чашек диаметром 15 см в количестве $15\text{--}17 \times 10^6$ на чашку. На следующий день монослой клеток с конфлюэнтностью 65–75% инфицировали рекомбинантными Ad, в дозе 10^7 БОЕ на чашку. Через двое суток, с наступлением 90–100% ЦПД, инфицированные клетки собирали, концентрировали низкоскоростным центрифугированием, ресуспендировали в буфере (0,01 M трис-HCl pH 8,0, 0,01 M NaCl, 5 mM ЭДТА) и подвергали трем циклам замораживания–оттаивания для разрушения клеточной и ядерной мембран и высвобождения вируса из клеток. Клеточные лизаты центрифугировали при 5000 об./мин в течение 10 мин на комнатной температуре, осадок удаляли.

Рекомбинантные аденовирусы очищали с помощью двукратного ультрацентрифугирования в градиенте CsCl (в ступенчатом и равновесном градиенте) на приборе Optima XPN-90 (Beckman Coulter Inc.; США).

Чистоту и идентичность Ad подтверждали с помощью ПЦР и полногеномным секвенированием. Титры очищенных вирусов определяли с использованием ТЦД₅₀ на культуре клеток HEK293 [24]. Учет результатов проводили на 10–12-й день после трансдукции клеток.

Определение количества аденовирусных частиц

Количество частиц определяли с использованием реагентов из набора Pico488 dsDNA quantification qit (Lumiprobe; США). В каждую лунку 96-луночного микропланшета вносили по 10 мкл калибровочных растворов (с известной концентрацией) и растворов испытуемого образца. Далее в лунки вносили по 10 мкл раствора для лизиса (TE буфер + 0,1% SDS),

перемешивали и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем в лунки вносили по 80 мкл раствора TE и по 100 мкл раствора для окрашивания и инкубировали в течение 5 мин. После этого определяли интенсивность флуоресценции измерением на спектрофлуориметре при длинах волн возбуждения 480 нм и эмиссии 520 нм. Далее строили график линейной зависимости интенсивности флуоресценции калибровочных растворов (ось ординат) от концентрации вирусных частиц (ось абсцисс).

Определение количества геномов аденовирусов

Тотальную ДНК выделяли с помощью набора «Wizard Genomic DNA Purification Kit» (Promega; США). Количество геномов определяли методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-PB) с помощью универсальных праймеров для всех трех исследуемых серотипов (F: 5'GGCGGCTGGCGGTAGAG, R: 5'GCAACATCTGGAACCGCG). Использовали смесь qPCRMix-HS SYBR («Евроген»; Россия) согласно инструкции производителя. ПЦР-PB проводили в автоматическом режиме на приборе CFX 96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad; США); данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Bio-Rad SFX (США).

Филогенетический анализ последовательностей геномов, фибров и пентонов аденовирусов различных серотипов

Нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов аденовирусов человека (45 серотипов) и обезьян (5 серотипов) были взяты из базы данных NCBI (США). С использованием программы Geneious Prime проводили выравнивание аминокислотных последовательностей исследуемых белков аденовирусов различных серотипов. Эволюционная история была выведена с использованием метода Neighbor-Joining [25]. Древо нарисовано в масштабе с длинами ветвей в тех же единицах, что и эволюционные расстояния, используемые для вывода филогенетического древа. Эволюционные расстояния рассчитывали с использованием метода number of differences и выражали в единицах количества аминокислотных различий на последовательность. Построение древа осуществляли в программе MEGA 11 [26].

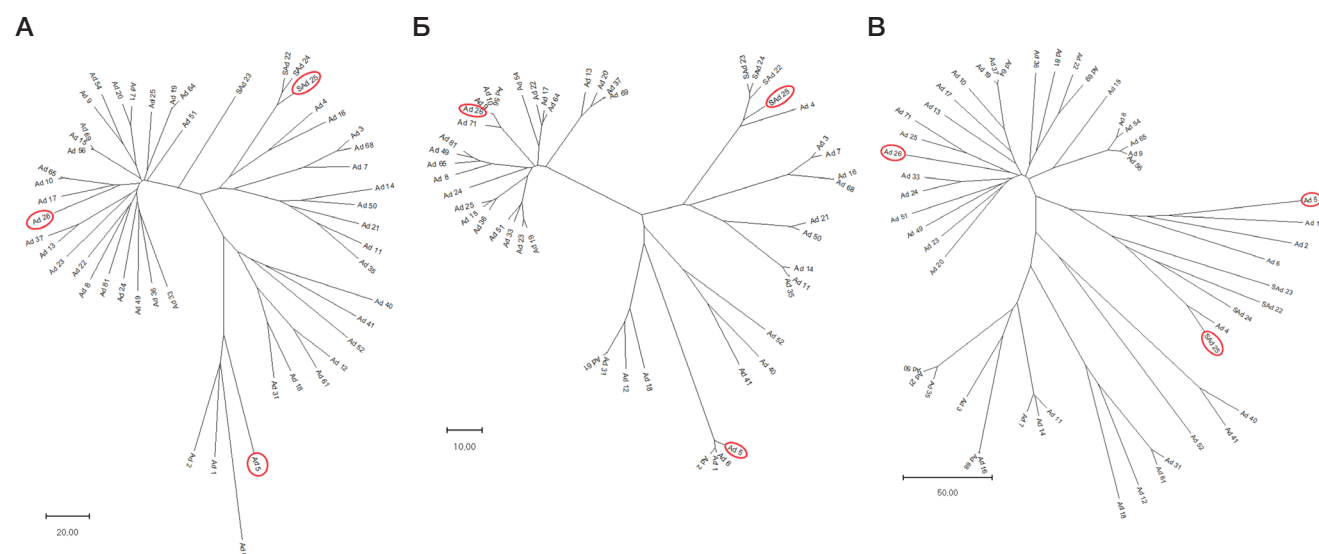


Рис. 1. Филогенетическое древо, показывающее родство последовательностей гексонов (А), пентонов (Б) и фибров (В) аденовирусов различных серотипов. Древо построено на основе аминокислотных последовательностей гексонов 45 серотипов аденовирусов человека и 5 серотипов аденовирусов обезьян. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода количества различий (number of differences method) и выражены в единицах аминокислотных различий на последовательность. Красным выделены Ad5, Ad26 и SAd25

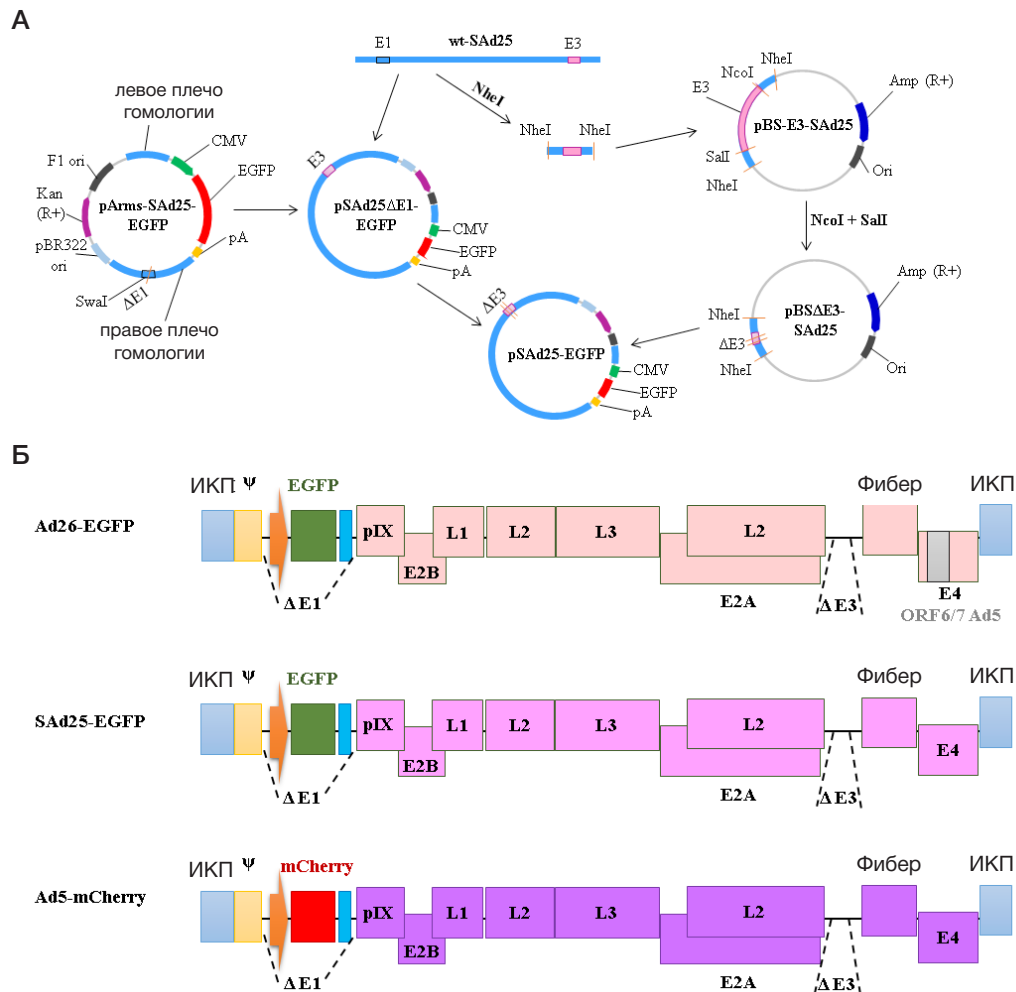


Рис. 2. Схемы рекомбинантных аденовирусных векторов. **А.** Схема создания плазмидной конструкции, содержащей полноразмерный геном аденовируса обезьян 25-го серотипа и несущей экспрессионную кассету с геном EGFP. **Б.** Схемы геномов рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусов, используемых в данном исследовании

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение гексонов, пентонов и фибров различных серотипов аденовирусов человека и обезьян

Поскольку структурные белки аденовируса гексон, пентон и фибер содержат типоспецифичные антигенные детерминанты, являющиеся мишенями для нейтрализующих антител, при выборе серотипа аденовируса для разработки новой векторной платформы важно учитывать то, насколько эти белки данного серотипа отличаются от аналогичных белков уже используемых рекомбинантных аденовирусов, в частности от Ad5 и Ad26. Поэтому после получения результатов полногеномного секвенирования wt-SAd25 нами был проведен филогенетический анализ аминокислотных последовательностей гексонов, пентонов и фибров различных серотипов и сравнение их с гексоном SAd25 (рис. 1).

По результатам анализа видно, что гексон, пентон и фибер SAd25 достаточно эволюционно удалены от тех же белков аденовирусов Ad5, (подгруппа C) и Ad26 (подгруппа D), которые использовали в вакцине «Спутник V», поэтому с высокой долей вероятности вируснейтрализующие антитела, сформированные вакцинацией Ad5 или Ad26, нацеленные на данные белки, не будут нейтрализовывать SAd25 и этот вектор может стать подходящим кандидатом

как при самостоятельном использовании, так и для праймирования или бустирования.

Конструирование вектора на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа

Рекомбинантный репликативно-дефектный вектор на основе SAd25 был сконструирован по стандартной схеме модификации вирусного генома, которую применяют для создания векторов на основе Ad5 и Ad26 (рис. 2А). Делеция E1-области превращает аденовирусный геном в дефектный по репликации (способен размножаться только в специальной клеточной линии). На месте удаленной E1-области находится кассета с репортерным геном (CMV-промотор, ген EGFP, сигнал полиаденилирования). Для увеличения пакующей емкости дополнительно проводили делецию E3-области. Плазмида, несущая геном рекомбинантного SAd25-EGFP, была сконструирована методом гомологичной рекомбинации в бактериальных клетках.

Получение инфекционного потомства аденовируса проводили в клетках линии HEK293, трансфицированных плазмидной конструкцией pSAd25-EGFP, у которой предварительно удалили векторную часть (содержащую точку начала репликации ori и ген канамицина). Несмотря на то что клетки HEK293 экспрессируют белки E1A-области, обладающие некоторой специфичностью, особенно E1B55K, нами показано, что в данной клеточной линии

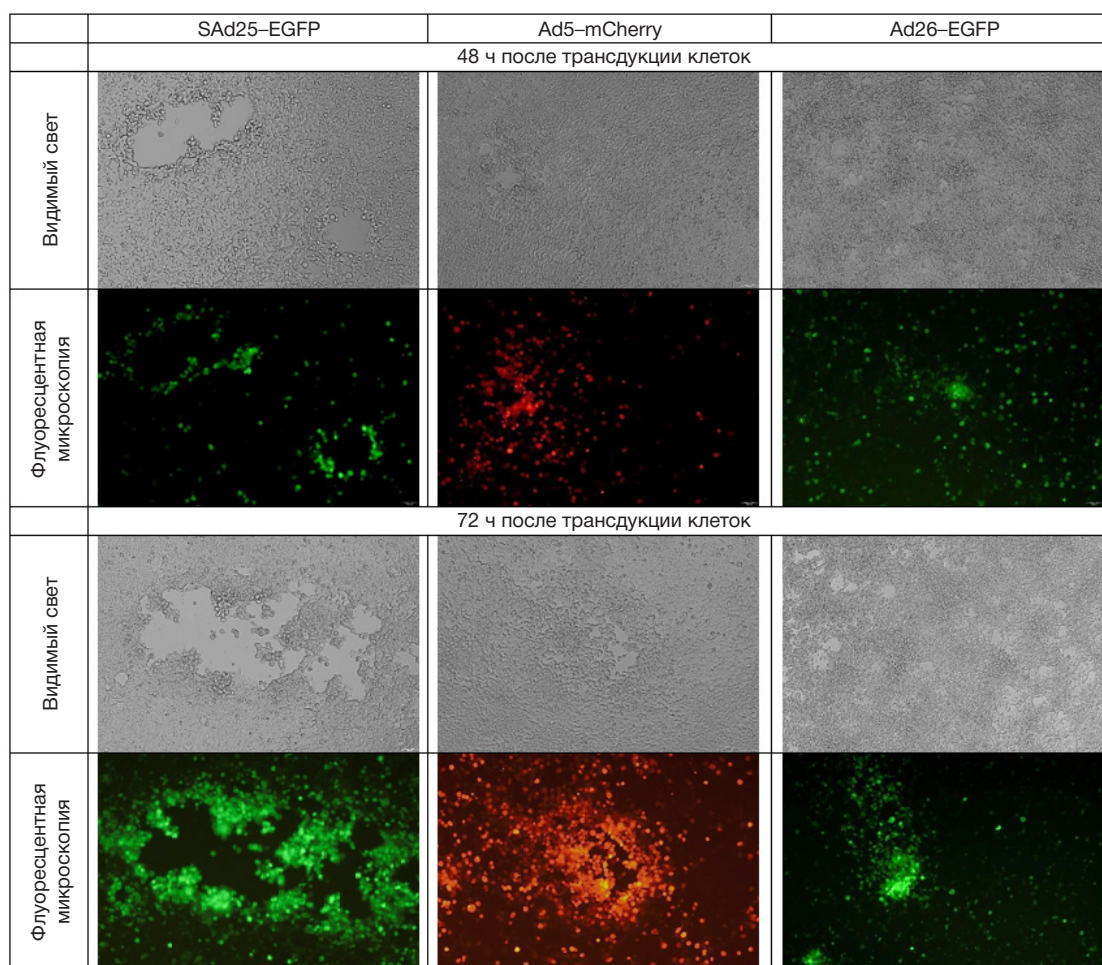


Рис. 3. Цитопатическое действие аденовирусов на клетки линии HEK293 через 48 и 72 ч после трансдукции

происходит эффективная сборка рекомбинантного аденовируса обезьян 25-го серотипа.

Исследование биологических и физических свойств нового аденовирусного вектора

Одна из немаловажных характеристик вирусного вектора — генетическая стабильность генома аденовируса. Для ее исследования провели ряд пассажей аденовируса SAd25-EGFP на культуре клеток HEK293. Геномную ДНК выделяли из пассажей № 1, 5 и 10, а затем изучали с помощью полногеномного секвенирования. Результаты показали, что мутаций в геноме не произошло, последовательности геномов со всех трех пассажей обладали 100% идентичностью, что позволяет заключить, что рекомбинантный аденовирус SAd25-EGFP остается генетически стабильным по крайней мере при 10-кратном пассировании в условиях *in vitro*.

Для сравнения эффективности репликации полученного аденовируса SAd25-EGFP и двух полученных ранее в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России рекомбинантных аденовирусов других серотипов (Ad5 и Ad26) использовали векторы, экспрессирующие гены флуоресцентных белков EGFP и mCherry (красный флуоресцентный белок). Аденовирусами SAd25-EGFP, Ad5-mCherry и Ad26-EGFP (схемы геномов представлены на рис. 2Б) трансдуцировали лунки 96-луночного планшета с клетками HEK293 (5×10^4 кл./лунка) в дозе 1×10^4 вирусных частиц (в. ч.) и инкубировали в течение 72 ч. Вирусные бляшки детектировали с помощью

инвертированного микроскопа Olympus IX73 (Olympus; Япония) с флуоресцентным модулем U-RFL-T (Olympus; Япония) во всех лунках, инфицированных разными аденовирусами. Вирусные бляшки, обнаруженные в клетках, инфицированных SAd25-EGFP, были заметно больше, чем в клетках, инфицированных другими аденовирусами, кроме того, отчетливо увеличена зона лизиса, что свидетельствует о более высокой вирусной цитотоксичности (рис. 3). Это согласуется с результатами, полученными для другого аденовируса обезьян — SAd23 [17].

Для более детального анализа эффективности репликации полученного аденовирусного вектора и сравнения с другими аденовирусными векторами SAd25-EGFP, Ad5-mCherry и Ad26-EGFP наращивали на десяти культуральных чашках (150 мм), проводили очистку методом ультрацентрифугирования, собирали в равном конечном объеме (2 мл). Конечный препарат может содержать вирусные частицы без генома (не упакованные или пустые), с полным геномом (упакованные или полные) или различные промежуточные формы между ними. Далее проводили физико-биологическую характеристику полученных аденовирусов (табл.).

Количество в. ч. SAd25-EGFP оказалось схожим с количеством в. ч. Ad5-mCherry и Ad26-EGFP, но инфекционный титр SAd25-EGFP оказался ниже, чем у Ad5 и Ad26. Полученные данные свидетельствуют о наличии большего количества неинфекционных вирусных частиц у SAd25-EGFP по сравнению с Ad5 и Ad26. Выход рекомбинантного аденовируса обезьян при этом оказался ниже в сравнении с Ad26-EGFP. Обнаружение

Таблица. Биологические и физические характеристики рекомбинантных аденовирусов

Серотип	ТЦД ₅₀ /мл	Число геномов/мл	Количество в.ч./мл	Число геномов/ТЦД ₅₀	Количество в.ч./ТЦД ₅₀
SAd25-EGFP	$2,15 \times 10^9$	$1,79 \times 10^{12}$	$1,15 \times 10^{12}$	833	535
Ad5-mCherry	$4,64 \times 10^9$	$1,01 \times 10^{12}$	$1,02 \times 10^{12}$	218	220
Ad26-EGFP	$6,81 \times 10^9$	$1,88 \times 10^{12}$	$1,91 \times 10^{12}$	276	281

большого количества вирусных геномов для SAd25-EGFP свидетельствует о наличии неупакованной вирусной ДНК. Таким образом, данные результаты показали, что рекомбинантный SAd25 эффективно накапливается в клетках HEK293. Ввиду наличия у SAd25-EGFP большого количества неинфекционных вирусных частиц и свободной вирусной ДНК требуется подбор оптимальных условий культивирования и очистки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аденовирусы обезьян уже долгое время являются объектами исследований вирусологов и изучаются на предмет их использования в качестве векторов для доставки целевых генов в клетки. Их неоспоримое преимущество — практически полное отсутствие вируснейтрализующих антител у людей к распространенным серотипам, в том числе к CAd63 и CAd68. Так, первым вектором на основе аденовируса шимпанзе стал вектор CAd68, у которого была делетирована E1-область [12]. В доклинических исследованиях вакцины против ВИЧ-1 было показано, что данный рекомбинантный аденовирус является высокоиммуногенным вакцинным вектором [20]. Позднее был разработан рекомбинантный аденовирусный вектор на основе аденовируса обезьян серотипа Y25, который в дальнейшем назвали ChAdOx1. Созданная на его основе вакцинная платформа обладает хорошим профилем безопасности, что показано в клинических исследованиях I–III фаз векторных вакцин на основе ChAdOx1, полученных для профилактики ряда болезней, включая грипп, туберкулез, малярию, рак предстательной железы, Ближневосточный респираторный синдром, лихорадку Зика и COVID-19 [27].

Аденовирус SAd25 обладает благоприятным профилем безопасности и высокой иммуногенностью [27], однако в России до сих пор отсутствуют вакцинные или генотерапевтические препараты на его основе, поэтому нами была разработана векторная платформа на основе SAd25 с перспективой дальнейшего применения в качестве вакцинной платформы.

На первом этапе своей работы мы провели биоинформатический анализ последовательности генома wt-SAd25. Наше внимание было сосредоточено на последовательностях гексона, пентона и фибера аденовируса, т. е. основных белках капсида вириона. Эпитопы, расположенные в гексоне, являются мишенями для нейтрализующих антител *in vivo*, распознаются цитотоксическими Т-клетками и служат одним из параметров при выделении аденовирусов в различные серотипы [28]. Поэтому важно было установить, насколько эволюционно удален гексон SAd25 от других серотипов, в том числе используемых при разработке вакцин Ad5 и Ad26. В результате показано, что гексон, пентон и фибер SAd25 достаточно эволюционно удалены от тех же белков Ad5 и Ad26. В связи с этим следующей нашей задачей стало создание векторной системы на основе SAd25.

Существует несколько методов конструирования аденовирусных векторов: клонирование, получение

вектора через космиды, использование метода гомологичной рекомбинации в бактериях и гомологичной рекомбинации в эукариотических клетках [29]. Среди них получение плазмиды, содержащей геном аденовируса, путем гомологичной рекомбинации челночного вектора, несущего области гомологии с геномом аденовируса и геномной аденовирусной ДНК в клетках *E. coli* штамма BJ5183, является одним из общепринятых методов, который также использовали в данной работе.

Большинство создаваемых векторов на основе аденовирусов, исследуемых в качестве кандидатных вакцин, относят к так называемым векторам первого поколения, у которых удалены E1- и E3-области генома. Удаление E1-области приводит к тому, что аденовирус становится репликативно-дефектным, т. е. не способным размножаться в клетках животных. Это существенно повышает безопасность и снижает вероятность возникновения побочных эффектов. Делеция еще одной области генома, E3, увеличивает возможный размер вставки до 8 т.п.н., обеспечивая гибкость в дизайне экспрессионной кассеты. Кроме того, данная делеция не влияет на рост в комплементирующей клеточной линии. В полученном нами рекомбинантном аденовирусном векторе на основе SAd25 были удалены обе упомянутые области, как E1, так и E3.

Для последующего клинического применения необходимо получить вектор, который будет эффективно реплицироваться в производственной культуре клеток. Поскольку в России для производства рекомбинантных аденовирусных векторов используют клеточную линию HEK293, которая является комплементирующей и содержит E1-область генома Ad5, в случае создания вектора с делетированной E1-областью, есть риск, что данный вектор будет образовывать при наращивании репликативно компетентные аденовирусные частицы. Однако в случае с SAd25 данный риск отсутствует, поскольку процент гомологии нуклеотидной последовательности этой области недостаточно высок и не будет происходить гомологичной рекомбинации между геномом SAd25 и E1-областью в клетках линии HEK293.

Для подтверждения стабильности вакцинного вектора на протяжении всего производственного процесса проверяется генетическая стабильность рекомбинантного вирусного вектора. Для ее исследования проводится такое количество пассажей вирусных векторов, которое превышает уровень, используемый в производстве, обычно 5–10 пассажей [30]. Частота мутаций в геноме репликативно-дефектного аденовируса считается редкой; но несмотря на это, данный анализ важен для оценки того, что не изменяется экспрессионная кассета, а соответственно и экспрессия целевого гена. Нами было проведено 10 пассажей полученного рекомбинантного аденовируса SAd25-EGFP, после чего геномную ДНК анализировали методом полногеномного секвенирования. Было установлено, что вектор на основе SAd25 генетически стабилен.

Дальнейшее получение и исследование аденовирусных векторов на основе SAd25, в том числе изучение безопасности и иммуногенности данного вектора, и их

сравнение с профилем безопасности и иммуногенностью уже существующих аденовирусных векторов (в том числе Ad5 и Ad26) будет способствовать расширению панели рекомбинантных вирусов, которые можно использовать при разработке средств для профилактики широкого круга инфекционных заболеваний.

ВЫВОДЫ

Получен рекомбинантный аденовирусный вектор на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа, в котором на месте E1-области генома находится экспрессионная кассета

с целевым геном (EGFP), а также удалена E3-область генома для увеличения его потенциальной генетической емкости. Данный рекомбинантный аденовирус способен эффективно реплицироваться в клеточной линии HEK293, используемой в производстве для наработки препаратов на основе аденовирусов. Отмечено, что у полученного аденовируса фенотип вирусных бляшек отличается от Ad5 и Ad26, поскольку бляшки SAd25 обладают большей зоной лизиса и более крупными размерами. Полученные данные свидетельствуют о возможности дальнейшего исследования аденовирусного вектора в качестве платформы для создания профилактических препаратов.

Литература

1. Tatsis N, Ertl HCJ. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther*. 2004; 10 (4): 616–29.
2. Appaiahgari MB, Vratil S. Adenoviruses as gene/vaccine delivery vectors: promises and pitfalls. *Expert Opin Biol Ther*. 2015; 15 (3): 337–51.
3. Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S, et al. Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis*. 2017; 4 (2): 43–63.
4. Trapnell BC, Gorziglia M. Gene therapy using adenoviral vectors. *Curr Opin Biotechnol*. 1994; 5 (6): 617–25.
5. Dolzhikova IV, Tokarskaya EA, Dzharullaeva AS, Tikhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Voronina OL, et al. Virus-Vectored Ebola Vaccines. *Acta Naturae*. 2017; 9 (3): 4–11.
6. Lundstrom K. Viral Vectors for COVID-19 Vaccine Development. *Viruses*. 2021; 13 (2): 317.
7. Henaff D, Salinas S, Kremer EJ. An adenovirus traffic update: From receptor engagement to the nuclear pore. *Future Microbiol*. 2011; 6 (2): 179–92.
8. ICTV. The ICTV report virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. 2022. Available from: <https://ictv.global/taxonomy/>.
9. Tapia MD, Sow SO, Ndiaye BP, Mbaye KD, Thiongane A, Ndour CT, et al. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a chimpanzee adenovirus vectored Ebola vaccine in adults in Africa: a randomised, observer-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (6): 707–18.
10. O'Hara GA, Duncan CJA, Ewer KJ, Collins KA, Elias SC, Halstead FD, et al. Clinical Assessment of a Recombinant Simian Adenovirus ChAd63: A Potent New Vaccine Vector. *J Infect Dis*. 2012; 205 (5): 772–81.
11. Younis BM, Osman M, Khalil EAG, Santoro F, Furini S, Wiggins R, et al. Safety and immunogenicity of ChAd63-KH vaccine in post-kala-azar dermal leishmaniasis patients in Sudan. *Mol Ther*. 2021; 29 (7): 2366–77.
12. Farina SF, Gao GP, Xiang ZQ, Rux JJ, Burnett RM, Alvira MR, et al. Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J Virol*. 2001; 75 (23): 11603–13.
13. Zhou D, Cun A, Li Y, Xiang Z, Ertl HCJ. A Chimpanzee-Origin Adenovirus Vector Expressing the Rabies Virus Glycoprotein as an Oral Vaccine against Inhalation Infection with Rabies Virus. *Mol Ther*. 2006; 14 (5): 662–72.
14. Napolitano F, Merone R, Abbate A, Ammendola V, Horncastle E, Lanzaro F, et al. A next generation vaccine against human rabies based on a single dose of a chimpanzee adenovirus vector serotype C. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14 (7): e0008459.
15. de Jong R, Stockhofe-Zurwieden N, Bonsing J, Wang KF, Vandepaer S, Bouzya B, et al. ChAd155-RSV vaccine is immunogenic and efficacious against bovine RSV infection-induced disease in young calves. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 6142.
16. Roy S, Gao G, Lu Y, Zhou X, Lock M, Calcedo R, et al. Characterization of a family of chimpanzee adenoviruses and development of molecular clones for gene transfer vectors. *Hum Gene Ther*. 2004; 15 (5): 519–30.
17. Luo S, Zhang P, Ma X, Wang Q, Lu J, Liu B, et al. A rapid strategy for constructing novel simian adenovirus vectors with high viral titer and expressing highly antigenic proteins applicable for vaccine development. *Virus Res*. 2019; 268: 1–10.
18. Belousova N, Mikheeva G, Xiong C, Soghomonian S, Young D, Le Roux L, et al. Development of a targeted gene vector platform based on simian adenovirus serotype 24. *J Virol*. 2010; 84 (19): 10087–101.
19. Bauza K, Malinauskas T, Pfander C, Anar B, Jones EY, Billker O, et al. Efficacy of a plasmodium vivax malaria vaccine using ChAd63 and modified vaccinia Ankara expressing thrombospondin-related anonymous protein as assessed with transgenic plasmodium berghei parasites. *Infect Immun*. 2014; 82 (3): 1277–86.
20. Fitzgerald JC, Gao GP, Reyes-Sandoval A, Pavlakis GN, Xiang ZQ, Wlazlo AP, et al. A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 Gag. *J Immunol*. 2003; 170 (3): 1416–22.
21. Roy S, Medina-Jaszek A, Wilson MJ, Sandhu A, Calcedo R, Lin J, et al. Creation of a panel of vectors based on ape adenovirus isolates. *J Gene Med*. 2011; 13 (1): 17–25.
22. Davis AR, Wivel NA, Palladino JL, Tao L, Wilson JM. Construction of adenoviral vectors. *Mol Biotechnol*. 2001; 18 (1): 63–70.
23. Logunov DY, Zubkova OV, Karyagina-Zhulina AS, Shuvalova EA, Karpov AP, Shmarov MM, et al. Identification of HI-Like Loop in CELO adenovirus fiber for incorporation of receptor binding motifs. *J Virol*. 2007; 81 (18): 9641–52.
24. Kanegae Y, Makimura M, Saito I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn J Med Sci Biol*. 1994; 47 (3): 157–66.
25. N Saitou, M Nei. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987; 4 (4): 406–25. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
26. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018; 35 (6): 1547–9.
27. Folegatti PM, Jenkin D, Morris S, Gilbert S, Kim D, Robertson JS, et al. Vaccines based on the replication-deficient simian adenoviral vector ChAdOx1: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine*. 2022; 40 (35): 5248–62.
28. Ebner K, Pinsker W, Lion T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *J Virol*. 2005; 79 (20): 12635–42.
29. Zhang W, Ehrhardt A. Getting genetic access to natural adenovirus genomes to explore vector diversity. *Virus Genes*. 2017; 53 (5): 675–83.
30. Fernandes P, Silva AC, Coroadinha AS, Alves PM. Upstream bioprocess for adenovirus vectors. In: *Adenoviral vectors for gene therapy*. Elsevier, 2016; p. 139–61.

References

1. Tatsis N, Ertl HCJ. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther*. 2004; 10 (4): 616–29.
2. Appaiahgari MB, Vratil S. Adenoviruses as gene/vaccine delivery vectors: promises and pitfalls. *Expert Opin Biol Ther*. 2015; 15 (3): 337–51.
3. Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S, et al. Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis*. 2017; 4 (2): 43–63.
4. Trapnell BC, Gorziglia M. Gene therapy using adenoviral vectors. *Curr Opin Biotechnol*. 1994; 5 (6): 617–25.
5. Dolzhikova IV, Tokarskaya EA, Dzharullaeva AS, Tikhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Voronina OL, et al. Virus-Vectorized Ebola Vaccines. *Acta Naturae*. 2017; 9 (3): 4–11.
6. Lundstrom K. Viral Vectors for COVID-19 Vaccine Development. *Viruses*. 2021; 13 (2): 317.
7. Henaff D, Salinas S, Kremer EJ. An adenovirus traffic update: From receptor engagement to the nuclear pore. *Future Microbiol*. 2011; 6 (2): 179–92.
8. ICTV. The ICTV report virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. 2022. Available from: <https://ictv.global/taxonomy/>.
9. Tapia MD, Sow SO, Ndiaye BP, Mbaye KD, Thiongane A, Ndour CT, et al. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a chimpanzee adenovirus vectored Ebola vaccine in adults in Africa: a randomised, observer-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (6): 707–18.
10. O'Hara GA, Duncan CJA, Ewer KJ, Collins KA, Elias SC, Halstead FD, et al. Clinical Assessment of a Recombinant Simian Adenovirus ChAd63: A Potent New Vaccine Vector. *J Infect Dis*. 2012; 205 (5): 772–81.
11. Younis BM, Osman M, Khalil EAG, Santoro F, Furini S, Wiggins R, et al. Safety and immunogenicity of ChAd63-KH vaccine in post-kala-azar dermal leishmaniasis patients in Sudan. *Mol Ther*. 2021; 29 (7): 2366–77.
12. Farina SF, Gao GP, Xiang ZQ, Rux JJ, Burnett RM, Alvira MR, et al. Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J Virol*. 2001; 75 (23): 11603–13.
13. Zhou D, Cun A, Li Y, Xiang Z, Ertl HCJ. A Chimpanzee-Origin Adenovirus Vector Expressing the Rabies Virus Glycoprotein as an Oral Vaccine against Inhalation Infection with Rabies Virus. *Mol Ther*. 2006; 14 (5): 662–72.
14. Napolitano F, Merone R, Abbate A, Ammendola V, Horncastle E, Lanzaro F, et al. A next generation vaccine against human rabies based on a single dose of a chimpanzee adenovirus vector serotype C. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14 (7): e0008459.
15. de Jong R, Stockhofe-Zurwieden N, Bonsing J, Wang KF, Vandepaer S, Bouzya B, et al. ChAd155-RSV vaccine is immunogenic and efficacious against bovine RSV infection-induced disease in young calves. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 6142.
16. Roy S, Gao G, Lu Y, Zhou X, Lock M, Calcedo R, et al. Characterization of a family of chimpanzee adenoviruses and development of molecular clones for gene transfer vectors. *Hum Gene Ther*. 2004; 15 (5): 519–30.
17. Luo S, Zhang P, Ma X, Wang Q, Lu J, Liu B, et al. A rapid strategy for constructing novel simian adenovirus vectors with high viral titer and expressing highly antigenic proteins applicable for vaccine development. *Virus Res*. 2019; 268: 1–10.
18. Belousova N, Mikheeva G, Xiong C, Soghomonian S, Young D, Le Roux L, et al. Development of a targeted gene vector platform based on simian adenovirus serotype 24. *J Virol*. 2010; 84 (19): 10087–101.
19. Bauza K, Malinauskas T, Pfander C, Anar B, Jones EY, Billker O, et al. Efficacy of a plasmodium vivax malaria vaccine using ChAd63 and modified vaccinia Ankara expressing thrombospondin-related anonymous protein as assessed with transgenic plasmodium berghei parasites. *Infect Immun*. 2014; 82 (3): 1277–86.
20. Fitzgerald JC, Gao GP, Reyes-Sandoval A, Pavlakis GN, Xiang ZQ, Wlazlo AP, et al. A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 Gag. *J Immunol*. 2003; 170 (3): 1416–22.
21. Roy S, Medina-Jaszek A, Wilson MJ, Sandhu A, Calcedo R, Lin J, et al. Creation of a panel of vectors based on ape adenovirus isolates. *J Gene Med*. 2011; 13 (1): 17–25.
22. Davis AR, Wivel NA, Palladino JL, Tao L, Wilson JM. Construction of adenoviral vectors. *Mol Biotechnol*. 2001; 18 (1): 63–70.
23. Logunov DY, Zubkova OV, Karyagina-Zhulina AS, Shuvalova EA, Karpov AP, Shmarov MM, et al. Identification of HI-Like Loop in CELO adenovirus fiber for incorporation of receptor binding motifs. *J Virol*. 2007; 81 (18): 9641–52.
24. Kanegae Y, Makimura M, Saito I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn J Med Sci Biol*. 1994; 47 (3): 157–66.
25. N Saitou, M Nei. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987; 4 (4): 406–25. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
26. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018; 35 (6): 1547–9.
27. Folegatti PM, Jenkin D, Morris S, Gilbert S, Kim D, Robertson JS, et al. Vaccines based on the replication-deficient simian adenoviral vector ChAdOx1: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine*. 2022; 40 (35): 5248–62.
28. Ebner K, Pinsker W, Lion T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *J Virol*. 2005; 79 (20): 12635–42.
29. Zhang W, Ehrhardt A. Getting genetic access to natural adenovirus genomes to explore vector diversity. *Virus Genes*. 2017; 53 (5): 675–83.
30. Fernandes P, Silva AC, Coroadinha AS, Alves PM. Upstream bioprocess for adenovirus vectors. In: *Adenoviral vectors for gene therapy*. Elsevier, 2016; p. 139–61.

ОДНОДОМЕННОЕ АНТИТЕЛО ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОНСЕРВАТИВНОГО ЭПИТОПА РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА БЕЛКА SPIKE КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2

П. О. Воробьев¹, С. В. Тиллиб^{1,2} ✉¹ Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия² Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

В последние три года с помощью разных технологий были разработаны несколько вакцин против COVID-19, а также получено большое число вирус-нейтрализующих антител к коронавирусу SARS-CoV-2 с целью борьбы с пандемией. Однако применение этих препаратов для профилактики и потенциального лечения сталкивается с существенными проблемами из-за появления новых мутантных вариантов вируса, как более контагиозных, так и ускользающих от иммунной нейтрализации, что постоянно требует обновления вакцин и разработки новых терапевтических антител. Целью данного исследования было использовать технологию создания однодоменных антител (нанотел) для таргетирования наиболее консервативных эпитопов рецептор-связывающего домена (RBD) поверхностного S-белка (шипа, Spike) широкого спектра вариантов SARS-CoV-2. Рекombинантные белки, соответствующие RBD трех актуальных штаммов SARS-CoV-2, а также полноразмерному S-белку (Wuhan), были использованы в качестве антигенов для иммунизации верблюда с целью индукции образования соответствующих антител и/или в качестве иммобилизуемых белков для последующих перекрестных процедур селекции клонов нанотел с заданной специфичностью методом фагового дисплея. Из генерированной иммунной библиотеки было отобрано нанотело, обладающее свойством эффективно узнавать консервативный участок RBD S-белка широкого спектра вариантов пандемического коронавируса SARS-CoV-2, включая омикрон. Помимо традиционного использования в иммуноанализе и диагностике, полученное нанотело потенциально может быть использовано в качестве модуля мишень-специфичного связывания для задержки коронавируса в верхних дыхательных путях человека при разработке новых комбинированных противовирусных препаратов.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, консервативный эпитоп, однодоменное антитело, нанотело, задержка вируса

Финансирование: работа была поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (договор № 075-15-2021-1086, контракт № RF—193021X0015).

Благодарности: М. В. Рутковской из института Проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН за помощь в работе по иммунизации верблюда.

Вклад авторов: П. О. Воробьев — проведение молекулярного клонирования и последующей наработки рекомбинантных белков (антигенов для иммунизации); С. В. Тиллиб — разработка общей идеи и реализация этапов иммунизации, способа получения и первичного анализа полученных однодоменных антител, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН (протокол № 17 от 11 февраля 2018 г.); работы с животными проводили в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р 53434–2009.

✉ **Для корреспонденции:** Сергей Владимирович Тиллиб
ул. Вавилова, д. 34/5, г. Москва, 119334, Россия; tillib@genebiology.ru sergei.tillib@gmail.com

Статья получена: 19.12.2022 **Статья принята к печати:** 25.01.2023 **Опубликована онлайн:** 24.02.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.005

SINGLE-DOMAIN ANTIBODY FOR BINDING THE CONSERVED EPITOPE IN THE SARS-COV-2 SPIKE PROTEIN RECEPTOR-BINDING DOMAIN

Vorobyev PO¹, Tillib SV^{1,2} ✉¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia² Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Several COVID-19 vaccines have been developed in the last three years using various techniques. Multiple virus-neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 have been also obtained to combat the pandemic. However, the use of these medications for prevention and potential treatment faces significant challenges due to the emergence of new mutant virus variants, both more contagious and escaping neutralization by the immune system, that is why it is necessary to continuously renew the vaccines and develop new therapeutic antibodies. The study was aimed to use the technology of generating single-domain antibodies (nanobodies) to target the surface spike (S) protein RBD conserved epitope of the broad spectrum of SARS-CoV-2 variants. Recombinant proteins that corresponded to RBDs of three important SARS-CoV-2 strains and the full-length S protein (Wuhan) were used as antigens for immunization of a camel in order to induce production of appropriate antibodies and/or as immobilized proteins for further cross selection of the nanobody clones with pre-set specificity by the phage display. A nanobody capable of effectively recognizing the conservative region in the S protein RBDs of the broad spectrum of pandemic SARS-CoV-2 variants, including Omicron, was selected from the generated immune library. Along with conventional use in immunoassays and diagnosis, the generated nanobody can be potentially used as a module for target-specific binding used to trap coronavirus in human upper airways during the development of novel combination antiviral drugs.

Keywords: SARS-CoV-2, conserved epitope, single-domain antibody, nanobody, virus retention

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement № 075-15-2021-1086, contract № RF—193021X0015).

Acknowledgements: the authors thank M.V. Rutovskaya, Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, for assistance in immunization of the camel.

Author contribution: Vorobyev PO — molecular cloning and subsequent production of recombinant proteins (antigens for immunization); Tillib SV — developing general conception, carrying out immunization, developing the method for acquisition and primary analysis of the generated single-domain antibodies, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences (protocol № 17 of 11 February 2018); the animal was handled in strict compliance with the guidelines of the National Standard of the Russian Federation GOST R 53434–2009.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sergei V. Tillib
Vavilov str., 34/5, Moscow, 119334, Russia; tillib@genebiology.ru sergei.tillib@gmail.com

Received: 19.12.2022 **Accepted:** 25.01.2023 **Published online:** 24.02.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.005

Большинство вирус-нейтрализующих антител против актуальных мишеней, таких как SARS-CoV-2, связываются с белковыми эпитопами на поверхности вирусной частицы и предотвращают взаимодействие вируса с клеточным рецептором, что необходимо для его проникновения в клетку. В случае с SARS-CoV-2 основной мишенью нейтрализующих антител является поверхностный белок Spike (шип), или S-белок (1300 а. о.). S-белок образует гомотример на поверхности вириона. Во время сборки вируса этот белок расщепляется на N-концевую область (S1) и C-концевую область (S2), которая непосредственно участвует в слиянии с клеточной мембраной клетки хозяина. В области S1 был идентифицирован рецептор-связывающий домен (RBD, 319–541 а. о. или, в минимальном варианте, 333–527 а. о.), который в открытой конформации S-белка взаимодействует с входным для вируса SARS-CoV-2 рецептором на поверхности клетки-хозяина — ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2). Последний запускает перестройку S-белка, что приводит к слиянию мембран и проникновению вируса в клетку. RBD состоит из двух субдоменов ядра с центральным β -слоем и внешнего субдомена или мотива связывания с рецептором (RBM, с 438 по 506 а. о.), который соединен с двумя соседними β -тяжами сердечника; RBM становится самым удаленным от поверхности вируса участком S-белка в его открытой конформации, связывающей рецептор. RBD (и особенно RBM) является основным антигенным участком S-белка и основной мишенью вирус-нейтрализующих антител [1–3].

С начала пандемии циркулирующие сегодня штаммы SARS-CoV-2 приобрели мутации по сравнению с исходным штаммом Wuhan (WA1). В частности, вариант B.1.617.2 (дельта) [4] и родственный ему B.1.617.1 (каппа) были первоначально идентифицированы в Индии и несут замены RBD L452R-T478K или L452R-E484Q соответственно, которые, вероятно, ответственны за их улучшенные характеристики контагиозности [4]. Идентифицированный в Южной Африке вариант B.1.1.529 (омикрон) содержит крайнюю эволюцию RBD с пятнадцатью заменами (например, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493K, G496S, Q498R, N501Y, Y505H) [5]. Мутации RBD, обнаруженные в этих вариантах, увеличивают риск снижения эффективности современных вакцин и терапевтических антител человека, могут способствовать вирусной эволюции и отбору новых вариантов, которые избегают нейтрализации иммунной системой человека. Таким образом, создание вирус-нейтрализующих антител широкого действия против различных штаммов (сегодняшних и будущих) коронавируса SARS-CoV-2 является крайне сложной задачей [6–8].

Использование ингаляционных препаратов на основе антител — очень перспективный метод для мишень-специфического воздействия и противодействия респираторным инфекциям в месте их первичного проникновения в организм человека, в верхних дыхательных путях [9]. Ингаляция — многообещающая неинвазивная стратегия доставки антител для лечения респираторных заболеваний, потому что этот путь обеспечивает более высокие концентрации антител в дыхательных путях, преодолевая ограничения и неопределенности в количестве препарата в нужном месте при системном введении антител через кровотоки. Назальный путь доставки лекарств — один из широкоисследованных способов введения, назальные спреи для ряда препаратов

были признаны успешными и разрешены для широкого использования. Респираторные вирусы, поражающие человека, попадают в организм через дыхательные пути в виде аэрозолей, образующихся при кашле или чихании, от других инфицированных людей. Большие аэрозольные частицы обычно задерживаются в носовых раковинах и пазухах, где они могут вызвать инфекции верхних дыхательных путей. Более мелкие частицы могут проникать в нижние дыхательные пути и вызывать более опасные инфекции в альвеолярных областях. Большинство вирусов, инфицирующих верхние дыхательные пути, вызывает острую инфекцию и заражают людей сезонно (например, респираторно-синцитиальный вирус (RSV), риновирус, вирусы парагриппа и гриппа А, аденовирус, метапневмовирус человека, бокавирус человека и коронавирус). Эпителиальные клетки слизистой оболочки — входные ворота для большинства респираторных вирусных инфекций. Вирус не сможет инициировать инфекцию, если его прикрепление к клетке блокировать в месте проникновения. Было показано, что частицы вируса гриппа могут задерживаться в слизи дыхательных путей человека вне зависимости от связывания гемагглютинина с остатками сиаловых кислот на муцинах [10]. Скорее всего, наблюдаемая задержка происходила за счет присутствия антител, связывающих как вирус гриппа, так и компоненты муцинового геля. Связь антител с муциновым гелем, по-видимому, обеспечивается посредством множественных низкоаффинных взаимодействий Fc-фрагмента антитела с муцином. Важно отметить, что подобные адгезивные взаимодействия между антителами, связывающимися с патогенами, и компонентами слизи дыхательных путей могут обеспечивать универсальную стратегию комбинированной борьбы с патогенами в дыхательных путях. Местная доставка антител, связывающих возбудителей респираторных инфекций, потенциально может снизить вероятность заболевания, а также вирусную нагрузку на эпителий дыхательных путей.

Одним из многообещающих и привлекающих все большее внимание форматов моноклональных антител, в том числе для разработки новых средств борьбы с респираторными инфекциями, в последние годы является формат однодоменных антител.

Однодоменными антителами (нанотелами) называют рекомбинантные производные однодоменных антиген-связывающих фрагментов (VHH) особых антител HCAb (heavy-chain only antibodies), состоящих из димера укороченной тяжелой цепи при полном отсутствии легких цепей, которые присутствуют в норме в крови представителей семейства Camelidae и у некоторых видов хрящевых рыб в дополнение к классическим типам иммуноглобулинов [11–12]. Основные особенности нанотел — небольшие размеры (12–15 кДа, 4 × 2,5 нм), высокие растворимость, стабильность, специфичность и аффинность, тепловая и химическая стойкость, а также простота осуществления их всевозможных модификаций методами генной инженерии и возможность использования чрезвычайно эффективного метода фагового дисплея для селекции оптимальных вариантов нанотел. Нанотела способны формировать необычные паратопы и узнавать необычные для классических антител уникальные нативные эпитопы антигенов (преимущественно конформационные эпитопы, небольшие углубления, активные центры ферментов), что может приводить к особо высокой специфичности узнавания заданных мишеней *in vivo*. Каркасные участки верблужьих нанотел

(VНН) имеют высокую гомологию (заметно выше, чем в случае с VН мыши) с каркасными участками вариабельных VН доменов иммуноглобулинов человека (подкласса IgG3). Производство нанотел в бактериях или любых иных системах экспрессии очень рентабельно, а нанотела могут быть легко использованы в качестве строительных блоков для многодоменных конструкций [13–14].

Уже были созданы перспективные антивирусные терапевтические препараты на основе нанотел. Например, получено несколько нанотел, специфично связывающих особенно консервативные участки гемагглютинина из разных подтипов вирусов гриппа [15]. Многодоменные конструкции, содержащие четыре различных нанотела, были встроены в вектор на основе аденоассоциированного вируса.

Показано на мышиной модели, что экспрессирующиеся многодоменные антитела, нацеленные сразу на несколько консервативных эпитопов, с высокой эффективностью предотвращают заражение вирусами гриппа А и В. Эта же стратегия может быть использована для предотвращения заражения и другими вирусами/патогенами с высокой вариабельностью. Важно отметить, что подобного препарата не удалось пока получить с помощью классических моноклональных антител.

В ряде недавно опубликованных работ описано получение нанотел против рецептор-связывающего домена (RBD) белка SARS-CoV-2 Spike с целью блокировать его взаимодействие с ACE2 и тем самым нейтрализовать вирус [16–17]. Это удалось сделать для многих вариантов SARS-CoV-2, кроме сильно мутировавшего штамма омикрон.

Сообщается о получении нанотела (Nb6), связывающего и блокирующего S-белок в полностью неактивной конформации, что не позволяет вирусу связываться с ACE2 [18]. С помощью аффинного созревания *in vitro* и тримеризации высокоаффинного производного нанотела удалось получить препарат с пикомолярной нейтрализующей активностью против инфекции SARS-CoV-2. Этот препарат сохранял стабильность и функцию после аэрозолизации, лиофилизации и термической обработки. Авторы предполагают возможным опосредованную аэрозолем доставку этого мощного нейтрализатора непосредственно в эпителий дыхательных путей.

Целью данного исследования было использовать технологию создания однодоменных антител для отбора нанотела против консервативного эпитопа RBD S-белка для широкого спектра вариантов SARS-CoV-2, включая омикрон. Такое нанотело мы рассматриваем в качестве потенциального вирус-связывающего модуля будущего аэрозольного комбинированного задерживающего вирус препарата, в котором будет также якорный модуль для связи с мажорными компонентами секрета верхних дыхательных путей человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наработка рекомбинантных белков, соответствующих рецептор-связывающим доменам S-белка трех актуальных штаммов SARS-CoV-2, а также полноразмерного S-белка (Wuhan)

Наработку RBD вирусного штамма SARS-CoV-2 (Wuhan) проводили с помощью плазмиды NR-52309, предоставленной Краммером с соавторами [19] (сайт BEI Resources, NIAID, NIH), в эукариотических клетках HEK293T по прилагаемому на сайте протоколу и как описано ранее [20]. Указанный вектор для RBD из коронавируса SARS-CoV-2, Wuhan-Hu-1 (GenBank: MN908947), был получен путем слияния N-концевой сигнальной последовательности S-белка с RBD (аминокислоты с 319 по 541) и с С-концевой гексагистидиновой меткой. Плазмиду, кодирующую целевой RBD, трансфецировали методом кальций-фосфатной трансфекции в клетки HEK293T, через три дня супернатант, содержащий RBD-белок, собирали, центрифугировали при 4 °C и 1500 g в течение 10 мин, очищенный супернатант смешивали с 5 мл Ni-NTA-агарозы (Qiagen; США), уравновешенной в фосфатно-солевом буфере, после чего инкубировали при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере (Biosan; Латвия) в течение часа при комнатной температуре. Суспензию наносили на колонку, следом промывали промывочным буфером ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 57 mM, NaCl 135 mM, Imidazol 20 mM), затем смывали RBD с помощью элюирующего буфера ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Consensus	MFMPSFSYSSWATCWLCCILIAKATMFVFLVLLPLVSSQVRVPTESIVRFPNITNLC	
RBD Wuhan	MFMPSFSYSSWATCWLCCILIAKATMFVFLVLLPLVSSQVRVPTESIVRFPNITNLC	60
RBD delta	MFMPSFSYSSWATCWLCCILIAKATMFVFLVLLPLVSSQVRVPTESIVRFPNITNLC	60
RBD omicron	MFMPSFSYSSWATCWLCCILIAKATMFVFLVLLPLVSSQVRVPTESIVRFPNITNLC	60
Consensus	PFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLCFTNVY	
RBD Wuhan	PFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLCFTNVY	120
RBD delta	PFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLCFTNVY	120
RBD omicron	PFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNLAFSTFKCYGVSPTKLNLCFTNVY	120
Consensus	ADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYYLYRLF	
RBD Wuhan	ADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYYLYRLF	180
RBD delta	ADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYYLYRLF	180
RBD omicron	ADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYYLYRLF	180
Consensus	RKSNLKPFRDISTEIQAGSKPCNGVEGFNCFYPLQSYGFGPTNGVGYQPYRVVLSFE	
RBD Wuhan	RKSNLKPFRDISTEIQAGSKPCNGVEGFNCFYPLQSYGFGPTNGVGYQPYRVVLSFE	240
RBD delta	RKSNLKPFRDISTEIQAGSKPCNGVEGFNCFYPLQSYGFGPTNGVGYQPYRVVLSFE	240
RBD omicron	RKSNLKPFRDISTEIQAGSKPCNGVAGFNCFYPLRSYFRPTYGVGHPYRVVLSFE	240
Consensus	LLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFHHHHHH	
RBD Wuhan	LLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFHHHHHH	271
RBD delta	LLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFHHHHHH	271
RBD omicron	LLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFHHHHHH	271

Рис. 1. Схема выравненных аминокислотных последовательностей RBD трех мутантных вариантов S-белка коронавируса SARS-CoV-2 (исходный RBD Wuhan, RBD delta и наиболее мутировавший вариант — RBD omicron). Выделены серым места мутаций аминокислотных остатков. Жирной линией обозначено положение рецептор-связывающего мотива (RBM), который непосредственно взаимодействует с ACE2-рецептором

57 mM, NaCl 135 mM, Imidazol 235 mM). Полученный белок диализовали с использованием диализной мембраны с порами 5 кДа (Merck; США) в фосфатно-солевом буфере. Очищенный белок анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Концентрацию белка определяли с помощью нормирования на известные концентрации бычьего сывороточного альбумина (BSA), а также с помощью Pierce BCA protein assay (ThermoFisher; США), оценку интенсивности поглощения проводили с использованием планшетного ридера CLARIOstar (BMG Labtech; США).

С целью получения RBD штаммов SARS-CoV-2 delta и omicron нами были внесены соответствующие точечные замены нуклеотидов (выделено на рис. 1) в исходную последовательность, кодирующую RBD, в составе вышеупомянутой плазмиды. Замены проводили с помощью специально синтезированных олигонуклеотидов методом безлигационного клонирования с помощью синтеза промежуточных перекрывающихся ПЦР-продуктов с использованием термоциклера T100 Thermal cycler (Bio-rad; США). После амплификации соответствующих фрагментов с помощью полимеразы PhusionTM high-fidelity DNA polymerase (ThermoFisher; США) амплифицированные фрагменты подвергали электрофорезу в 1%-м агарозном геле и вырезанные фрагменты выделяли с помощью набора Cleanup Standart («Евроген»; Россия). Амплифицированный вектор и вставку инкубировали в течение 3 мин при 37 °C с T4-полимеразой, после чего T4-полимеразу инактивировали при 75 °C в течение 15 мин, инкубировали 1 мин во льду, затем полученную смесь использовали для проведения трансформации компетентных клеток TOP10. Экспрессию и очистку RBD проводили, как описано ранее [20].

Используемые для мутагенеза олигонуклеотиды представлены в табл. 1 (координаты соответствуют тем, что

даны на рис. 1). В случае варианта RBD delta воспроизводили мутации L176R, T202K. Для синтеза последовательности, кодирующей RBD штамма SARS-CoV-2 omicron в исходную плазмиду, кодирующую RBD штамма SARS-CoV-2, были внесены нуклеотидные замены, соответствующие мутациям G63D, R70K, S95L, S97P, S99F, K141N, N164K, G170S, S201N, T202K, E208A, Q217R, G220S, Q222R, N225Y, Y229N.

Полученные в результате клонирования последовательности проверяли методом секвенирования по Сенгеру с помощью олигонуклеотидов RBD new flanc for 53 или CAG seq (табл. 1).

Экспрессию и очистку полноразмерного белка Spike SARS-CoV-2 проводили в соответствии с опубликованным ранее протоколом [19, 20], как описано выше, с тем отличием, что экспрессировали Spike вместо RBD (с использованием плазмидной ДНК pSFHT pCAGGS-wt Spike-Trb-T4-HT, предоставленной Краммером). Нарработку и очистку проводили так же, как описано для RBD [20].

Проведение иммунизации и получение библиотеки кДНК-последовательностей, кодирующих нанотела

Работу с верблюдом, содержащимся в просторном вальере, с регулярным выгуливанием и питанием, в Центре коллективного пользования «Живая коллекция диких видов млекопитающих» на научно-экспериментальной базе «Черноголовка» института Проблем экологии и эволюции имени А. Н. Северцова РАН, проводили в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р 53434–2009. Двугорбого верблюда *Camelus bactrianus* последовательно иммунизировали пять раз (через четыре недели после первой инъекции, а затем каждый последующий этап инъекций проводили через 10–14 дней) путем подкожного введения антигенного материала, смешанного с равным

Таблица 1. Олигонуклеотиды (праймеры) для точечного мутагенеза

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'–3'
<i>Для RBD delta</i>	
RBD delta for 63	atctgaagcccttcgagcgggacatctccaccgagatctatcaggccggcagcaaaccttg
RBD flanc rev 63	tctgctagctcgagtcgcgac
Vector for 59	atcttaagtgcgcgactcgagc
Vector rev 59	gtcggccacgcgaattgc
RBD new rev 55	gtggagatgtcccgtcgaagggttcagattggacttccggaacagccggtatctgtaattg
RBD new flanc for 53	gtggagatgtcccgtcgaagggttcagattggacttccggaacagccggtatctgtaattg
<i>Для RBD omicron</i>	
LIC ins for II 65	ccccttcGACgaggtgttcaatgccaccAAGttgcctctg
LIC ins omi I for 61	ctgtacaacCTCgccCCGttcTTTacttcaagtgtacggcgtgtcccc
LIC ins omi I for 63	gggctgATGccccacgccGTAtgtgggCCGaaaACTgttaggaTCGcagtGGGAAG
LIC ins omi II rev 65	ttgaagccTGccacgccgttacaaggAAAGTTgccggcctgatag
LIC vec omi I for 58	CaTACggcgtgggcCatcagccc
LIC vec omi I rev 59	AAAgaaCGGggcGAGgtttacagcacggagtagtcg
LIC vec omi II for 63	ttgtaacggcgtgGCAggcttcaactgc
LIC vec omi II rev 65	attgaacacctcGTCgaaggggcacagattg
SDM II omi for 55	gtggcaactacaattacAGAtaccggcgtgtcc
SDM II omi rev 56	TgactttggagtcagTTTgttgctg
SDM omi for 54	atatcgccgactacaactac
SDM omi for 55	tgctgtctgtccagg
CAG seq for rbd	tcctgggcaacgtgctgg
CAG seq rev rbd	agatgctcaaggggc

объемом полного (при первой инъекции) или неполного (при остальных инъекциях) адьюванта Фройнда. В качестве антигенного материала для иммунизации использовали 0,5 мг смеси рекомбинантных белков, соответствующих RBD Wuhan и RBD delta. Взятие крови (150 мл) проводили через пять дней после последней инъекции. Для предотвращения свертывания взятой крови добавляли 50 мл стандартного фосфатно-солевого раствора (PBS), содержащего гепарин (100 ед./мл) и ЭДТА (3 мМ). Кровь разводили в 2 раза раствором PBS, содержащим 1 мМ ЭДТА, и 35 мл разбавленного раствора крови насливали на ступеньку объемом 15 мл специальной среды (Histopaque-1077; Sigma-Aldrich, США) с плотностью 1,077 г/мл; проводили центрифугирование в течение 20 мин при 800 g. Мононуклеарные клетки (лимфоциты и моноциты) отбирали из интерфазной зоны плазма/Histopaque, после чего промывали раствором PBS, содержащим 1 мМ ЭДТА. Суммарную РНК из В-лимфоцитов выделяли с помощью реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific; США). Затем, на колонке с олиго(dT)-целлюлозой из тотальной РНК очищали поли(А)-содержащую РНК. Концентрацию РНК определяли с помощью биофотометра (Eppendorf; Германия) и проверяли качество выделенной РНК с помощью электрофореза в 1,5%-м агарозном геле с формальдегидом. Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью обратной транскриптазы Maxima (Thermo Fisher Scientific; США) и праймера олиго(dT)18 в качестве затравки. Продукты обратной транскрипции использовали в качестве матрицы в двухступенчатой полимеразной цепной реакции и полученные продукты амплификации клонировали по сайтам NcoI(PstI) и NotI в фагмидный вектор, как описано ранее [21]. Для клонирования использовали экспрессионный вектор pHEN4 [22], любезно предоставленный профессором S. Muyldermans (Vrije Universiteit Brussel, Belgium).

Селекция клонов нанотел, связывающихся с RBD; форматирование, продукция и анализ отобранных анти-RBD нанотел

Последующие процедуры селекции, базирующиеся на методе фагового дисплея, в котором в качестве фаго-помощника использовали бактериофаг M13KO7 (New England Biolabs; США), проводили в основном аналогично указанным выше [21].

Для наращивания культур бактериальных клеток использовали инкубаторы-шейкеры Excella E24 и E25 (New Brunswick Scientific; США). Для центрифугирования использовали центрифуги 5810R и 5415R с охлаждением (Eppendorf; Германия). Рекомбинантные белки, получение которых описано выше, были иммобилизованы в лунках иммунологического планшета Maxisorp (Nunc; Denmark).

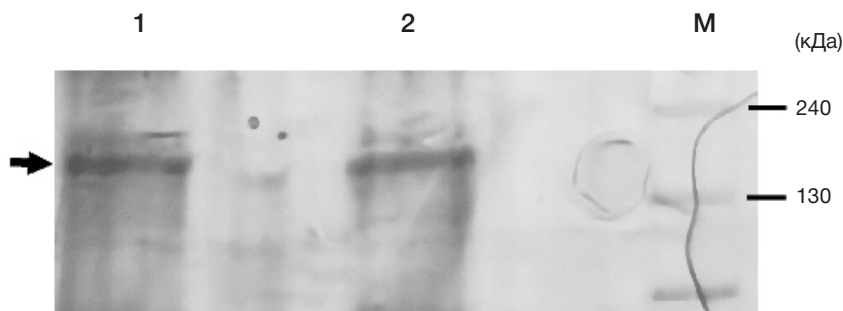


Рис. 3. Электрофорезная SDS-полиакриламидная гелевая с наработанным рекомбинантным S-белком (Spike) SARS-CoV-2 (Wuhan). Белок выявляли в цитоплазматической фракции (1) и во фракции осадка (2). Справа нанесен маркер молекулярного веса полипептидов

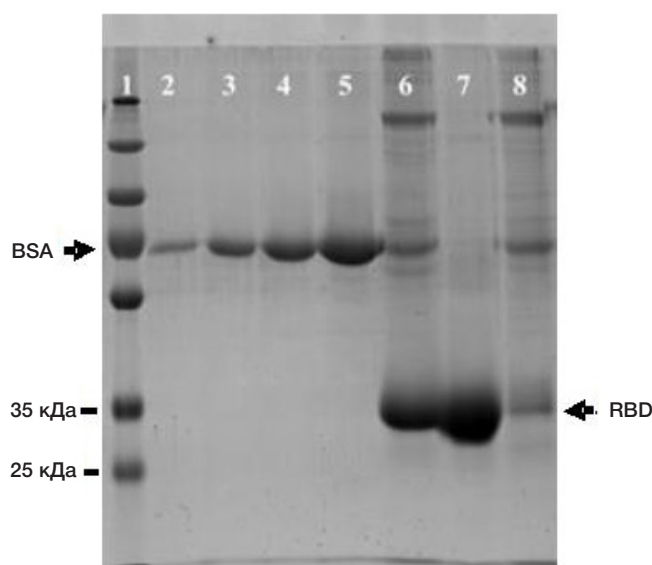


Рис. 2. Электрофорезная SDS-полиакриламидная гелевая с наработанными (с помощью клонированной кодирующей последовательности) и затем очищенными рекомбинантными RBD трех штаммов (6 — RBD delta, 7 — RBD Wuhan, 8 — RBD omicron). Слева — дорожка с маркерными белками (Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, размером 10–250 кДа). Для определения количества наработанного белка в дорожках 2–5 нанесены разные количества маркерного белка BSA (в количестве 0,25, 0,5, 1,0 и 2,0 мг соответственно)

Лунки блокировали в 1% БСА (бычий сывороточный альбумин) в 1× PBS или в казеиновом блокирующем буфере (Sigma-Aldrich; США). В последовательных селекциях использовали чередование как антигенов, так и блокирующих белков. Отбираемые клоны последовательностей, кодирующих нанотел, группировали согласно идентичности из HMR-фингерпринт-подобных образов и проверяли активность экспрессируемых нанотел (с НА-тагом на С-конце) в составе периплазматических экстрактов [21]. Перспективные клоны переклонировали, добавляя на 3'-конец последовательности, кодирующей нанотел, дополнительные последовательности длинного шарнирного участка особых антител верблюда (в качестве линейного гибкого линкера), а также НА-таг и His-таг для детекции и эффективной очистки нанотела, как описано ранее [23]. Все экспрессионные конструкции содержали лидерную последовательность pelB для периплазматической экспрессии нанотела, что позволяет эффективно выделять нанотел методом осмотического шока, не разрушая собственно бактериальные клетки. Нанотела экспрессировали в клетках *E. coli* (штамм XL1). Экспрессию белка в экспоненциально растущих клетках индуцировали добавлением 0,2–1 мМ ИПТГ (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид) и клетки инкубировали при интенсивном перемешивании в течение 5 ч при 30 °C

или в течение ночи при 28 °С. Рекомбинантные белки выделяли из периплазматического экстракта с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (Qiagen; США) в соответствии с рекомендациями производителя. Периплазматический экстракт, содержащий нанотело с НА-тагом на С-конце, или аффинно очищенное адаптированное нанотело применяли для оценки специфичности и эффективности связывания нанотела с препаратом иммобилизованного в иммунологической плашке антигена с помощью традиционного иммуоферментного анализа (ИФА). В качестве вторичных антител к НА-тагу использовали конъюгированные с пероксидазой хрена анти-НА-моноклональные антитела (H6533, Sigma-Aldrich; США). Активность пероксидазы хрена определяли, используя в качестве хромогенного субстрата 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific; США). Оптическую плотность измеряли после добавления равного объема серной кислоты (2 M) при длине волны 450 нм с помощью планшетного флуориметра Microplate Reader Multiscan EX (Thermo Labsystems; США). Контрольные лунки не содержали антиген, но далее были блокированы и процессированы параллельно с экспериментальными ячейками (с антигеном). Для конкурентного анализа нанотел использовали коммерческие препараты: вирус-нейтрализующее моноклональное мышиное нантитело XR19 («Хема»; Россия), которое в настоящее время проходит регистрацию и выпускается как опытная партия, а также антитела кролика к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой («ИМТЕК»; Россия). Измерения проводили трижды и результаты ИФА представляли как средние значения со стандартным отклонением, которое было не более 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На начальном этапе работы были проклонированы, а затем наработаны рекомбинантные белки, соответствующие рецептор-связывающим доменам S-белка трех актуальных штаммов SARS-CoV-2 (рис. 2). Выход нарабатываемых белков в расчете на 10^8 клеток: RBD delta — 2200 нг, RBD Wuhan — 2446 нг, RBD omicron — 300 нг, мембрано-ассоциированный полноразмерный S-белок Wuhan (рис. 3) — 75 нг. Если рекомбинантные белки, соответствующие RBD delta и RBD Wuhan, нарабатывались достаточно эффективно, то в случае RBD omicron воспроизводимо получали существенно меньше белка. Возможно, это связано с особенностями вторичной структуры белка, которая может хуже в случае RBD omicron образовываться в данной системе экспрессии. Когда мы начинали эту работу, еще не было информации о последовательности RBD omicron, поэтому для иммунизации верблюда была взята смесь белков RBD delta и RBD Wuhan. RBD omicron позднее использовали на стадии селекции.

Тогда же на стадии селекции и проверочного ИФА использовали наработанный рекомбинантный белок, соответствующий полной последовательности S-белка SARS-CoV-2 (Wuhan) (рис. 3).

В результате иммунизации двугорбого верблюда титр IgG, связывающих RBD delta и RBD Wuhan, в иммунной сыворотке по сравнению с преиммунной заметно вырос (примерно в 40 раз). На основе мПНК из лимфоцитов периферической крови иммунизированного верблюда мы проклонировали в фагмидном экспрессионном векторе pHEN4 кДНК-последовательности, кодирующие

весь репертуар однодоменных антиген-узнающих последовательностей (VHH, однодоменные антитела, нанотела) особых антител верблюда, состоящих из гомодимера укороченных (без СН1-домена) тяжелых цепей при отсутствии легких цепей. Полноценную библиотеку VHH-кДНК-последовательностей перевели с использованием фага-помощника M13KO7 в формат фаговых частиц и использовали для перекрестных селекций с тремя вариантами наработанных RBD. Для селекции последовательно использовали лунки иммунологического планшета с высокой сорбцией (Nunc Maxisorp) с иммобилизованными в PBS в концентрации 10 мкг/100 мкл рекомбинантными белками (RBD Wuhan, RBD delta и RBD omicron). Для блокировки использовали 1% БСА (Sigma-Aldrich; США) в PBS или казеиновый блокирующий буфер (Sigma-Aldrich; США). Процедуру селекции и последующей амплификации отбираемых фаговых частиц (содержащих ген однодоменного нанотела внутри, а экспрессирующееся однодоменное нанотело — в составе поверхностного фагового белка pIII) повторяли, как правило, последовательно три раза, параллельно используя разную последовательность инкубации с каждым из трех вариантов иммобилизованных антигенов. Если первые два варианта RBD были использованы для иммунизации, и к ним не составляло труда отобрать нанотела, то ожидаемо оказалось непросто отобрать нанотело, эффективно связывающее и RBD omicron. Последовательности клонов отобранных нанотел группировали согласно схожести их фингерпринтов, получаемых при электрофоретическом разделении продуктов гидролиза амплифицированных последовательностей однодоменных нанотел параллельно тремя рестрикционными эндонуклеазами (HinfI, MspI, RsaI). Для оценки специфичной активности отобранных нанотел, представляющих каждую из групп, проводили микроиндукцию синтеза нанотел в периплазме бактерий и выделяли периплазматический экстракт, в котором содержались нарабатываемые нанотела. Эти периплазматические экстракты с нанотелами, содержащими на С-конце НА-таг (антигенная детерминанта, фрагмент из 9 аминокислот YPYDVPDYA), использовали в иммуоферментном анализе (ИФА) для выявления наиболее перспективных вариантов нанотел. В качестве вторичных антител к НА-тагу использовали конъюгированные с пероксидазой хрена анти-НА-моноклональные антитела (H6533, Sigma-Aldrich; США). В результате проделанных селекций и ИФА нам удалось отобрать девять различных вариантов (групп) клонов нанотел. Из них сразу выделим одно наиболее перспективное нанотело, названное aRBDce1 (anti-RBD conserved epitope 1), удовлетворившее всем основным требованиям, которые были нами исходно поставлены.

Отобранные клонированные последовательности, кодирующие нанотела, адаптировали для более эффективной наработки в бактериальной системе экспрессии и последующей эффективной очистки нанотела, как описано ранее [23]. Получаемые нанотела содержат на С-конце длинную линкерную последовательность (из 28 аминокислот длинного варианта шарнирного участка неканонического верблюжьего антитела), после которой идут два пептидных фрагмента: НА-таг, позволяющий детектировать нанотело с помощью коммерческих антител к этому пептиду, и последовательность из шести остатков гистидина (His)6-тэг, позволяющая эффективно очищать содержащий ее белок с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе. Выделенные адаптированные нанотела тестировали

на их функциональную активность. Первоначальное тестирование проводили с помощью ИФА, в котором проверяли эффективность связывания полученными нанотелами консервативного эпитопа RBD S-белка для трех разных мутантных вариантов коронавируса SARS-CoV-2. На рис. 4 представлен результат иммуноферментного анализа, из которого следует, что нанотело aRBDce1 (в концентрации 1 мкг/мл) высокоэффективно и лучше других параллельно отобранных вариантов нанотел связывается с иммобилизованными в лунках планшета рекомбинантными белками Spike, RBD Wuhan (W-RBD), RBD delta (Δ -RBD) и Omicron RBD, но практически не связывается с контрольной лункой. В качестве контроля использовали лунки с иммобилизованным белком БСА (бычий сывороточный альбумин). Интенсивность сигнала отражает эффективность связывания нанотел. По сравнению с другими полученными нами ранее и охарактеризованными нанотелами к другим мишеням, можно предполагать высокую аффинность связывания нанотела aRBDce1 с RBD (в нижнем наномолярном диапазоне); aRBDce1 — пока единственное нами отобранное нанотело, эффективно связывающее все используемые варианты RBD, в том числе RBD omicron и полноразмерный S-белок.

На рис. 5 представлен результат ИФА, в котором иммобилизованный RBD (Wuhan) вначале связывали-блокировали повышенными концентрациями индивидуальных вариантов отобранных нанотел (20 мкг/мл), затем промывали лунки и добавляли коммерческое вирус-нейтрализующее моноклональное мышинное нантитело XR19 («Хема»; Россия) в концентрации 1 мкг/мл (все антитела растворяли в PBS с 0,1% БСА). Затем после промывки добавляли антитела кролика к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой, и проводили определение связавшейся пероксидазы, как описано выше. Можно видеть, что нанотело aRBDce1 совсем не конкурирует за связывание с этим «вирус-нейтрализующим» (по данным фирмы-производителя) антителом. На основании полученных результатов можно с высокой вероятностью предполагать, что нам удалось выполнить поставленную задачу и получить однодоменное

антитело, с высокой эффективностью связывающее консервативный поверхностный (легко доступный) эпитоп RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2. На рис. 6 приведена аминокислотная последовательность полученного нанотела aRBDce1, а также показано, как выглядит это адаптированное очищенное нанотело при фракционировании в 14%-м SDS-полиакриламидном геле. Полученные данные легли в основу недавно поданной патентной заявки (рег. № 2022132017).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В соответствии с поставленной задачей в данной работе с помощью технологии генерирования нанотел с заданной специфичностью и последующего их эффективного отбора методом фагового дисплея было получено нанотело, связывающее один из консервативных антигенных эпитопов RBD S-белка, который присутствует у трех разных вариантов коронавируса SARS-CoV-2, включая наиболее мутантный вариант омикрон. Таким образом, мы продемонстрировали подход, который позволяет получать подобные нанотела. Принципиальным отличием нашего подхода от многих подобных исследований (некоторые из них упомянуты во введении [16–18]) является то, что мы не фокусируемся на вирус-нейтрализующих вариантах нанотел, а стремимся получить нанотела к наиболее консервативным и при этом наиболее доступным (на поверхности вируса) эпитопам поверхностных вирусных белков. Известно, что в случае Spike-белка наиболее консервативные эпитопы находятся в его С-концевой области (S2), которая непосредственно участвует в слиянии с клеточной мембраной клетки хозяина. Однако наши собственные неопубликованные данные о нанотелах к подобной области белка гемагглютинаина у вируса гриппа указывают на возможные пространственные затруднения для нанотела достичь такие эпитопы *in vivo*. RBD-участок S-белка содержит наиболее доступные для связывания эпитопы, причем в нем есть районы с относительно небольшой частотой мутагенеза [6–8]. Мы выбрали в качестве первоначальной мишени этот RBD-участок как потенциально наиболее доступный

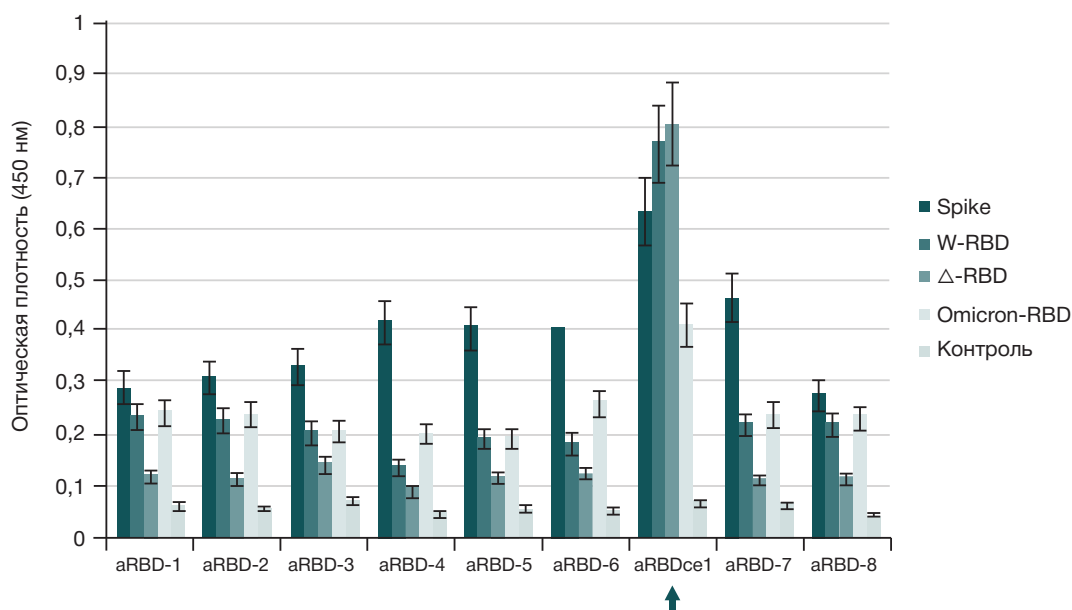


Рис. 4. Результат иммуноферментного анализа связывания девяти отобранных вариантов нанотел (aRBD-1 – aRBD-8 и aRBDce1) с иммобилизованными рекомбинантными белками, соответствующими (слева направо) Spike, RBD Wuhan (W-RBD), RBD delta (Δ -RBD) и Omicron RBD, и с контрольной лункой, без антигена, но блокированной с 1% БСА (как и все другие лунки). Величины оптической плотности отражают эффективность связывания нанотел. Даны средние значения трех независимых экспериментов с обозначением стандартного отклонения

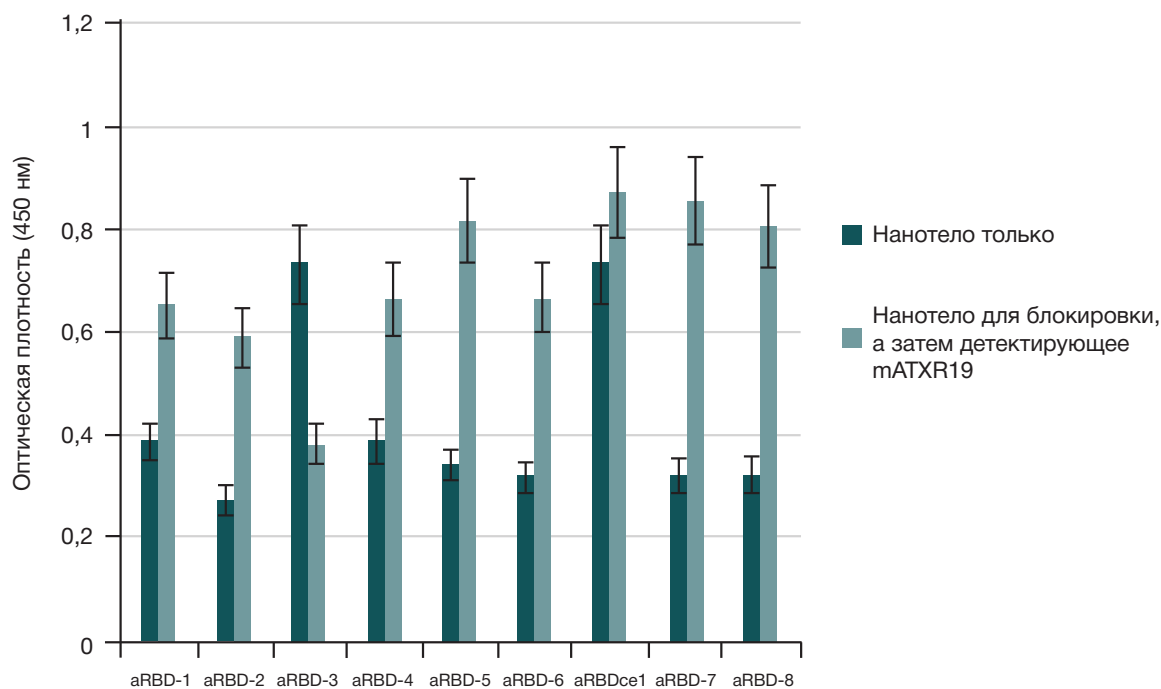


Рис. 5. Результат иммуноферментного анализа для выявления конкуренции за связывание с иммобилизованным в лунке RBD Wuhan отобранных вариантов нанотел и вирус-нейтрализующего моноклонального антитела XR19 («Хема»; Россия). Величины оптической плотности отражают эффективность связывания нанотел. Даны средние значения трех независимых экспериментов с обозначением стандартного отклонения

для связывания нанотелом, которое мы рассматриваем в качестве потенциального вирус-связывающего модуля будущего аэрозольного комбинированного задерживающего вирус препарата, в котором будет также якорный модуль для связи с мажорными компонентами секрета верхних дыхательных путей человека. Мы предполагаем, что таких связывающих модулей желательно иметь несколько к различным эпитопам, чтобы меньше зависеть от новых мутаций. Кроме того, в перспективе мы рассматриваем использование инактивированной полной вирусной частицы в качестве максимально приближенного к нативному набору антигенов для иммунизации и последующих селекций с целью генерирования подобного описанному в этой работе подхода к генерированию нанотел к консервативным поверхностным эпитопам вируса.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в данной работе продемонстрирован способ получения нанотела (aRBDce1) к консервативному эпитопу рецептор-связывающего домена основного поверхностного белка Spike коронавируса SARS-CoV-2, используя рекомбинантные белки, соответствующие этому домену у разных актуальных мутантных вариантов вируса, и применяя высокоэффективную технологию генерирования однодоменных антител. Помимо традиционного использования в иммуноанализе и диагностике, полученное нанотело потенциально может быть использовано в качестве модуля мишень-специфичного связывания коронавируса при разработке новых комбинированных противовирусных препаратов.

malgvqlvesggglvqaggsrlscas**gtinvmg**wyrqapqkqr~~elvs~~**smsrvgiitsadsve**
grftisrdngkntvylqmnslkpedtavyyo**tagldfradty**wgggtqvtvss
epkipqpqpqpqpqpqpqpqpqpqppepsrgvypdyvdysgrghhhhhh*

A

Б

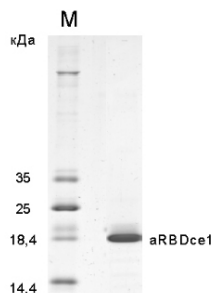


Рис. 6. Нанотело aRBDce1. **А.** Аминокислотная последовательность нанотела, выведенная из проклонированной адаптированной кодирующей последовательности ДНК. В указанной последовательности подчеркнуты соответственно (слева направо, от N- к С-концу) гипервариабельные участки CDR1, CDR2 и CDR3, которые являются определяющими для специфичного узнавания нанотелом aRBDce1 консервативного эпитопа RBD S-белка коронавируса. *Серым* цветом выделены присоединенные к С-концу нанотела линкерный линейный участок, HA-таг и His-таг. **Б.** Электрофореграмма 14%-го SDS-полиакриламидного геля с нарабатанным и затем очищенным адаптированным нанотелом aRBDce1

Литература

- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020; 181 (2): 271–80.
- Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020; 181 (2): 281–92.
- Zhou T, Tsybovsky Y, Gorman J, Rapp M, Cerutti G, Chuang G-Y, et al. CryoEM Structures of SARS-CoV-2 Spike Without and With ACE2 Reveal a pH Dependent Switch to Mediate Endosomal Positioning of Receptor-Binding Domains. *Cell Host Microbe*. 2020; 28 (6): 867–79.e5.
- Dhawan M, Sharma A, Priyanka S, Thakur N, Rajkhowa TK, Choudhary OP. Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: Mutations, impact, challenges and possible solutions. *Hum Vaccin Immunother*. 2022; 18 (5): 2068883.
- Mannar D, Saville JW, Zhu X, Srivastava SS, Berezhuk AM, Tuttle KS, et al. SARS-CoV-2 Omicron Variant: Antibody Evasion and Cryo-EM Structure of Spike Protein-ACE2 Complex. *Science*. 2022; 375 (6582): eabn7760.
- Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 Variants, Spike Mutations and Immune Escape. *Nat Rev Microbiol*. 2021; 19 (7): 409–21.
- Starr TN, Greaney AJ, Dingens AS, Bloom JD. Complete Map of SARS-CoV-2 RBD Mutations That Escape the Monoclonal Antibody LY-CoV555 and its Cocktail With LY-Cov016. *Cell Rep. Med*. 2021; 2 (4): 100255.
- Rees-Spear C, Muir L, Griffith SA, Heaney J, Aldon Y, Snitselaar JL, et al. The Effect of Spike Mutations on SARS-CoV-2 Neutralization. *Cell Rep*. 2021; 34 (12): 108890.
- Paray HA, Shukla S, Perween R, Khatri R, Shrivastava T, Singh V, et al. Inhalation monoclonal antibody therapy: a new way to treat and manage respiratory infections. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021; 105 (16–17): 6315–32.
- Wang YY, Harit D, Subramani DB, Arora H, Kumar PA, Lai SK, et al. Influenza-binding antibodies immobilise influenza viruses in fresh human airway mucus. *Eur Respir J*. 2017; 49: 1601709.
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Bajana Songa E, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993; 363: 446–8.
- Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet*. 2010; 11: 47–59.
- Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 77: 13–22.
- Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013; 82: 775–97.
- Laursen NS, Friesen RHE, Zhu X, Jongeneelen M, Blokland S, Vermond J, et al. Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. *Science*. 2018; 362 (6414): 598–602.
- Güttler T, Aksu M, Dickmanns A, Stegmann KM, Gregor K, Rees R, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 by highly potent, hyperthermostable, and mutation-tolerant nanobodies. *The EMBO Journal*. 2021; 40: e107985. DOI: 10.15252/embj.2021107985.
- Casasnovas JM, Margolles Y, Noriega MA, Guzmán M, Arranz R, Melero R, et al. Nanobodies protecting from lethal SARS-CoV-2 infection target receptor binding epitopes preserved in virus variants other than omicron. *Front Immunol*. 2022; 13: 863831.
- Schoof M, Faust B, Saunders RA, Sangwan S, Rezelj V, Hoppe N, et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike. *Science*. 2020; 370 (6523): 1473–9.
- Krammer F, Amanat F, Strohmeier S. Vector pCAGGS Containing the SARS-Related Coronavirus 2, Wuhan-Hu-1 Spike Glycoprotein Receptor Binding Domain (RBD), NR-52309. Available from: <https://www.beiresources.org/Catalog/BEIPlasmidVectors/NR-52309.aspx>.
- Stadlbauer D, Amanat F, Chromikova V, Jiang K, Strohmeier S, Arunkumar GA, et al. SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: a detailed protocol for a serological assay, antigen production, and test setup. *Curr Protoc Microbiol*. 2020; 57 (1): e100.
- Тиллиб С. В., Иванова Т. И., Васильев Л. А. Фингерпринтный анализ селекции «нанотел» методом фагового дисплея с использованием двух вариантов фагов-помощников. *Acta Naturae*. 2010; 2 (3): 100–8.
- Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett*. 1997; 414 (3): 521–6. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)01062-4. PMID: 9323027.
- Tilib S, Ivanova TI, Vasilev LA, Rutovskaya MV, Saakyan SA, Gribova IY, et al. Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2). *Antiviral Research*. 2013; 97: 245–54.

References

- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020; 181 (2): 271–80.
- Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020; 181 (2): 281–92.
- Zhou T, Tsybovsky Y, Gorman J, Rapp M, Cerutti G, Chuang G-Y, et al. CryoEM Structures of SARS-CoV-2 Spike Without and With ACE2 Reveal a pH Dependent Switch to Mediate Endosomal Positioning of Receptor-Binding Domains. *Cell Host Microbe*. 2020; 28 (6): 867–79.e5.
- Dhawan M, Sharma A, Priyanka S, Thakur N, Rajkhowa TK, Choudhary OP. Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: Mutations, impact, challenges and possible solutions. *Hum Vaccin Immunother*. 2022; 18 (5): 2068883.
- Mannar D, Saville JW, Zhu X, Srivastava SS, Berezhuk AM, Tuttle KS, et al. SARS-CoV-2 Omicron Variant: Antibody Evasion and Cryo-EM Structure of Spike Protein-ACE2 Complex. *Science*. 2022; 375 (6582): eabn7760.
- Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 Variants, Spike Mutations and Immune Escape. *Nat Rev Microbiol*. 2021; 19 (7): 409–21.
- Starr TN, Greaney AJ, Dingens AS, Bloom JD. Complete Map of SARS-CoV-2 RBD Mutations That Escape the Monoclonal Antibody LY-CoV555 and its Cocktail With LY-Cov016. *Cell Rep. Med*. 2021; 2 (4): 100255.
- Rees-Spear C, Muir L, Griffith SA, Heaney J, Aldon Y, Snitselaar JL, et al. The Effect of Spike Mutations on SARS-CoV-2 Neutralization. *Cell Rep*. 2021; 34 (12): 108890.
- Paray HA, Shukla S, Perween R, Khatri R, Shrivastava T, Singh V, et al. Inhalation monoclonal antibody therapy: a new way to treat and manage respiratory infections. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021; 105 (16–17): 6315–32.
- Wang YY, Harit D, Subramani DB, Arora H, Kumar PA, Lai SK, et al. Influenza-binding antibodies immobilise influenza viruses in fresh human airway mucus. *Eur Respir J*. 2017; 49: 1601709.
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Bajana Songa E, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993; 363: 446–8.
- Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet*. 2010; 11: 47–59.
- Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 77: 13–22.

14. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem.* 2013; 82: 775–97.
15. Laursen NS, Friesen RHE, Zhu X, Jongeneelen M, Blokland S, Vermond J, et al. Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. *Science.* 2018; 362 (6414): 598–602.
16. Güttler T, Aksu M, Dickmanns A, Stegmann KM, Gregor K, Rees R, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 by highly potent, hyperthermostable, and mutationtolerant nanobodies. *The EMBO Journal.* 2021; 40: e107985. DOI: 10.15252/embj.2021107985.
17. Casasnovas JM, Margolles Y, Noriega MA, Guzmán M, Arranz R, Melero R, et al. Nanobodies protecting from lethal SARS-CoV-2 infection target receptor binding epitopes preserved in virus variants other than omicron. *Front Immunol.* 2022; 13: 863831.
18. Schoof M, Faust B, Saunders RA, Sangwan S, Rezelj V, Hoppe N, et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike. *Science.* 2020; 370 (6523): 1473–9.
19. Krammer F, F Amanat F, Strohmeier S. Vector pCAGGS Containing the SARS-Related Coronavirus 2, Wuhan-Hu-1 Spike Glycoprotein Receptor Binding Domain (RBD), NR-52309. Available from: <https://www.beiresources.org/Catalog/BEIPlasmidVectors/NR-52309.aspx>.
20. Stadlbauer D, Amanat F, Chromikova V, Jiang K, Strohmeier S, Arunkumar GA, et al. SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: a detailed protocol for a serological assay, antigen production, and test setup. *Curr Protoc Microbiol.* 2020; 57 (1): e100.
21. Tillib SV, Ivanova TI, Vasilev LA. Fingerpryntnyj analiz selekcii «nanotel» metodom fagovogo displeya s ispol'zovaniem dvux variantov fagov-pomoshnikov. *Acta Naturae.* 2010; 2 (3): 100–8. Russian.
22. Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* 1997; 414 (3): 521–6. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)01062-4. PMID: 9323027.
23. Tillib S, Ivanova TI, Vasilev LA, Rutovskaya MV, Saakyan SA, Gribova IY, et al. Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2). *Antiviral Research.* 2013; 97: 245–54.

ПОДХОД К КЛАСТЕРИЗАЦИИ ПАЦИЕНТОВ ПО МИКРОЧИПОВЫМ ДАННЫМ ВНУТРИ ОТДЕЛЬНЫХ ЛОКУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМБИНАЦИЙ ВАРИАНТОВ

Л. Н. Юльметова, Н. А. Кулемин, Е. И. Шарова 

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

Дистрофия роговицы Фукса является социально значимым наследственным заболеванием. Более половины случаев в европейской популяции вызваны увеличением числа тринуклеотидных повторов в гене *TCF4*. Целью исследования было разработать и проверить подход разделения пациентов на группы на основе результатов чип-генотипирования и полногеномного ассоциативного исследования (GWAS). В качестве исходных данных использовали датасеты FECD Genetics Multi-center Study и проекта AREDS в количестве 1721 клинических случаев и 2408 контрольных пациентов. При анализе результатов GWAS было проведено разделение пациентов и группы контроля на две группы методом иерархической кластеризации с учетом предположения, что пациенты с увеличенным числом повторов в гене *TCF4* имеют определенные сочетания геномных вариантов (гаплотипов). Показано, что одиночные варианты не могут быть использованы для молекулярно-генетической классификации пациентов с увеличенным числом повторов в гене *TCF4* из-за рассогласованности результатов по вариантам. При этом гаплотипный подход превзошел анализируемые варианты по параметру отношения шансов, перекрывая 95%-й доверительный интервал выборок двух экспериментальных исследований. Предложенный метод позволяет продолжать поиск биологически обоснованных сочетаний геномных вариантов.


Ключевые слова: полногеномное ассоциативное исследование, эндотелиальная дистрофия роговицы, экспансия тринуклеотидных повторов, классификация пациентов, локус

Финансирование: работа выполнена в рамках гранта Президента РФ для молодых ученых-кандидатов наук МК-2951.2022.1.4.

Благодарности: авторы благодарят dbGaP за предоставление доступа к наборам данных phs000421.v1.p1 и phs000001.v3.p1. Набор данных с регистрационным номером dbGaP phs000421.v1.p1 получен из исследования генетики эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса (FECD) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/study.cgi?study_id=phs000421.v1.p1. Авторы признают гранты, финансировавшие регистрацию случаев и контролей, которые будут использоваться в этом GWAS: R01EY016514 (DUEC, PI: Gordon Klintworth), R01EY016482 (CWRU, PI: Sudha Iyengar) и 1X01HG006619-01 (PI: Sudha Iyengar, Натали Афшари). Авторы благодарят участников FECD и исследовательскую группу FECD за их ценный вклад в это исследование. Набор данных с регистрационным номером dbGaP phs000001.v3.p1 получен из базы данных исследования возрастных заболеваний глаз (AREDS) по адресу https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/study.cgi?study_id=phs000001.v3.p1. Финансовая поддержка AREDS была предоставлена Национальным глазным институтом (N01-EY-0-2127). Авторы благодарят участников AREDS и исследовательскую группу AREDS за их ценный вклад в это исследование. Авторы благодарят научного сотрудника ФГБУ ФНКЦ ФХМ имени Ю. М. Лопухина Л. О. Скородумову за ценные предложения, замечания и поддержку.

Вклад авторов: Е. И. Шарова — идея и подбор данных; Е. И. Шарова, Л. Н. Юльметова — планирование и выбор методов; Н. А. Кулемин — финансирование и администрирование проекта; Л. Н. Юльметова — разработка и вычисления; Е. И. Шарова, Л. Н. Юльметова, Н. А. Кулемин — обсуждение результатов, написание и редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации, с использованием наборов данных проектов phs000421.v1.p1 и phs000001.v3.p1., доступ к которым одобрен и получен через dbGaP в соответствии с их политикой одобрения и доступа к конкретным наборам данных.

 **Для корреспонденции:** Елена Ивановна Шарова
ул. Малая Пироговская, д. 1с3, г. Москва, 119435, Россия; sharova78@gmail.com

Статья получена: 12.12.2022 **Статья принята к печати:** 20.01.2023 **Опубликована онлайн:** 12.02.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.001

THE APPROACH TO PATIENT CLUSTERING BASED ON THE MICROCHIP DATA CONFINED TO DISTINCT LOCI USING THE COMBINATIONS OF VARIANTS

Iulmetova LN, Kulemin NA, Sharova EI 

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Fuchs' endothelial corneal dystrophy is a socially significant hereditary disease. More than a half of cases in the European population are caused by the increased number of trinucleotide repeats in the *TCF4* gene. The study was aimed to develop and test the approach of dividing patients into groups based on the chip-based genotyping and genome-wide association study (GWAS) results. The analysis was conducted using FECD Genetics Multi-center Study and AREDS project datasets containing the data of 1721 clinical cases and 2408 control patients. When analyzing the GWAS results, the patients and the control group were divided into two groups by means of hierarchical clustering suggesting that patients with the increased number of repeats in the *TCF4* gene are carriers of specific combinations of genomic variants (haplotypes). It was shown that individual variants cannot be used for the molecular genetic stratification of patients with the increased number of repeats in *TCF4* due to inconsistent results obtained for the variants. Furthermore, the haplotype-based approach outperformed the SNPs in terms of odds ratio. The paper proposes a method that enables further search for the biologically relevant combinations of genomic variants.


Keywords: genome wide association study, Fuchs endothelial corneal dystrophy, trinucleotide repeat expansion, patient stratification, locus

Funding: the study was supported by the President of the Russian Federation (grant for young postdocs MK-2951.2022.1.4)

Acknowledgements: the authors thank dbGaP for providing access to the phs000421.v1.p1 and phs000001.v3.p1 datasets. The dataset with the dbGaP registration number phs000421.v1.p1 was obtained from the genetic study of Fuchs' endothelial corneal dystrophy (FECD) available from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/study.cgi?study_id=phs000421.v1.p1. The authors recognize the grants that have been used to support registration of cases and controls and would be used in this GWAS: R01EY016514 (DUEC, PI: Gordon Klintworth), R01EY016482 (CWRU, PI: Sudha Iyengar) and 1X01HG006619-01 (PI: Sudha Iyengar, Natalie Afshari). The authors express their gratitude to the FECD study participants and the FECD research team for their valuable contribution to this study. The dataset with the dbGaP registration number phs000001.v3.p1 was obtained from the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) database available from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/study.cgi?study_id=phs000001.v3.p1. AREDS was funded by the National Eye Institute (N01-EY-0-2127). The authors thank the AREDS participants and research team for their valuable contribution to this study. The authors express their gratitude to L.O. Skorodumova, research fellow at the Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, for valuable suggestions, comments, and support.

Author contribution: Sharova EI — concept and selection of data; Sharova EI, Iulmetova LN — planning and selection of methods; Kulemin NA — project funding and management; Iulmetova LN — design and computation; Sharova EI, Iulmetova LN, Kulemin NA — discussion, manuscript writing and editing.

Compliance with ethical standards: the study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki using the data of the phs000421.v1.p1 and phs000001.v3.p1 projects, the access to which was approved and provided by dbGaP in accordance with the policy of approval and access to specific datasets.

 **Correspondence should be addressed:** Elena I. Sharova
Malaya Pirogovskaya, 1, str. 3, Moscow, 119435, Russia; sharova78@gmail.com

Received: 12.12.2022 **Accepted:** 20.01.2023 **Published online:** 12.02.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.001

Поиск биологического обоснования наследуемости фенотипов является одной из основных задач современной медицинской генетики. Исторически все известные подходы к поиску патогенных геномных вариантов делят на две группы: биологические и математические. К биологическим методам относятся подходы объяснения фенотипа на основе изученных биохимических процессов, а к математическим — различные статистические подходы. В случае, когда невозможно напрямую проследить биохимическую цепь формирования фенотипа, но развитие заболевания явно отягощено семейным анамнезом, применяют различные статистические подходы: полногеномные ассоциативные исследования (Genome-Wide Association Studies, GWAS) [1], методы оценки полигенных рисков (Polygenic Risk Score, PRS) [2], подходы по выделению гаплотипов [3] и другие методы. Однако у каждого из методов есть свои особенности и ограничения. При вычислении по алгоритмам GWAS полиморфизм оценивают независимо, а затем производят фильтрацию по критерию значимости. Таким образом, результат любого заболевания, являющегося совокупностью редких наследуемых мутаций, с помощью данного подхода будет некорректным, так как максимально значимыми окажутся не относящиеся к фенотипу полиморфизмы или вообще ни один полиморфизм не преодолеет критерии фильтрации. Подход PRS представляет собой расширение методологии GWAS, однако он тоже основан на предположении, что все используемые в модели однонуклеотидные варианты (single nucleotide polymorphisms, SNP) независимы. К тому же PRS-модели не воспроизводятся между популяциями при воспроизводимости локусов точек, на которых они построены, т. е. использования одиночных вариантов явно недостаточно для построения моделей и классификации пациентов. Кроме того, существует значительное количество заболеваний, генетическую структуру которых не удастся определить ни биологическими, ни популярными статистическими подходами. Чаще всего в основе алгоритма наследования таких фенотипов находятся гаплотипные структуры. Под гаплотипом подразумевается линейно сцепленная совокупность из нескольких (в том числе до нескольких сотен) вариабельных вариантов, которые совместно образуют небольшое (менее 100, в среднем 10–20) количество вариантов аллелей. Подход с выявлением конкретных вариантов гаплотипов активно используют в фармакогенетике при анализе цитохромов P450. Для CYP2D6, например, существует более 120 гаплотипных вариантов, которые обусловлены более чем 500 полиморфизмами [4]. Однако подобный подход очень редко обсуждают для большинства локусов полигенных заболеваний.

Особой популярностью GWAS-исследования пользуются при изучении заболеваний с вовлечением нервной системы, в том числе нарушений развития и нейродегенеративных патологий с полигенной природой, таких как боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона, шизофрения, патологии аутистического спектра. Они позволяют выявлять участки генома, изменения в которых перепредставлены у больных по сравнению с общей популяцией. Интересным свойством GWAS является возможность выявления локусов, патогенным вариантом в которых является не однонуклеотидный вариант из структуры чипа, а структурная вариация, напрямую чипом не детектируемая, но выявляемая по сцепленным с ней SNP. В частности, в GWAS бокового амиотрофического склероза детектируется локус в гене C9orf72, содержащий

увеличенный шестинуклеотидный повтор G4C2 (GGGGCC) [5], при этом варианты повтора непосредственно чипом не детектируются. В GWAS болезни Хантингтона выявляется локус гена *HTT* в 15-й хромосоме, содержащий тринуклеотидные повторы [6], при этом в чипе нет проб, соответствующих непосредственно участку повтора.

Эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса (ДФ) — наследственное заболевание глаз, характеризующееся уменьшением количества эндотелиальных клеток роговицы, поддерживающих водный баланс стромы роговицы. ДФ является полигенным заболеванием и представляет значительный интерес для исследования генетики [7]. Существуют две формы ДФ: ранняя и поздняя. Они различаются генетическими причинами. Ранняя форма диагностируется в возрасте до 50 лет, встречается очень редко и связана с патогенными вариантами гена *COL8A2* [8]. Поздний дебют ДФ проявляется в возрасте старше 50 лет и является наиболее распространенной формой ДФ. Было показано, что поздний дебют ДФ ассоциирован с экспансией тринуклеотидных повторов CTG18.1 в интроне гена *TCF4* [9]. По нашим данным и данным зарубежных авторов, экспансия тринуклеотидных повторов CTG18.1 в гене *TCF4* является наиболее частым вариантом, ассоциированным с ДФ, среди популяций европейского происхождения. Экспансия по крайней мере одного аллеля тринуклеотидного повтора CTG18.1 была обнаружена примерно у двух третей пациентов с ДФ в когорте европейского происхождения. Позднее Афшари и др. [10] предприняли попытку с помощью GWAS в большой когорте найти другие варианты, связанные с ДФ. Они подтвердили ассоциацию установленного локуса *TCF4*, а также идентифицировали три новых локуса в генах *KANK4*, *LAMC1* и вблизи гена *ATP1B1*, однако их независимость от экспансии тринуклеотидного повтора не была проверена [10]. Обсуждается также роль мутаций в генах *ZEB1* [11], *SLC4A11* [12], *AGBL1* [13] и *LOXHD1* [14] как каузальных и независимых от экспансии повторов для реализации ДФ. Вопрос о том, является ДФ набором фенкопий или полигенным заболеванием, до сих пор остается открытым. Но известное бессимптомное носительство экспансии повторов [9, 15] и спорность четкой моногенной связи ДФ с некоторыми другими генами позволяют предположить, что ДФ с поздним началом — это набор полигенных фенкопий, что делает ее схожей с другими болезнями экспансий с поздней манифестацией.

В связи с этим представляется интересным вопрос — можно ли и с какой точностью разделить пациентов на группы внутри локусов по результатам GWAS. И если речь идет о ДФ позднего начала, можно ли по данным микрочипового анализа определить пациентов с фенкопией с экспансией и без нее? Сравнимы ли для этих целей использование гаплотипного подхода/комбинаций вариантов и носительство минорных аллелей отдельных генетических вариантов? Целью данной работы было разработать и проверить подход разделения пациентов на группы на основе результатов чип-генотипирования и полногеномного ассоциативного исследования (GWAS).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Изложенный в статье анализ был выполнен на образцах следующих двух выборок базы данных dbGaP: мультицентрового исследования по изучению дистрофии Фукса (FECG Genetics Multi-center Study) [16] и исследования возрастных заболеваний глаз

(Age-Related Eye Disease Study AREDS, Refractive Error Substudy) [17–18] с использованием чипов Illumina HumanOmni2.5-4v1. Клинические проявления заболевания были классифицированы с использованием модифицированной оценочной шкалы Krachmer J., основанной на результатах биомикроскопии щелевой лампой [19].

Контроль качества данных осуществляли на уровне образцов и на уровне вариантов. Для подготовки данных генотипирования использовали программное обеспечение PLINK 1.9 [20], GRAF 2.4 [21–22], а также собственный программный код, написанный на языке R версии 4.1.0.

Для контроля качества вариантов на первом шаге были удалены генотипы с низкими показателями качества прочтения GenCall (GC) путем удаления вариантов с $GC < 0,3$. В анализ были включены маркеры, удовлетворяющие следующим критериям: доля пропущенных генотипов $< 10\%$, частота минорного аллеля $> 1\%$, число ошибок Менделевского наследования < 2 , p -value точного теста на равновесие Харди–Вайнберга $> 1 \times 10^{-10}$ для контрольных образцов и p -value $> 1 \times 10^{-15}$ — для пациентов с ДФ. Маркеры, являющиеся дубликатными, т. е. маркеры с различными ID, но идентичными геномными позициями и кодировкой аллелей, были детектированы и проанализированы отдельно. Пары дубликатных маркеров с дискордантными генотипами более чем в 10 образцах были полностью удалены из рассмотрения. Из каждой пары дубликатов с 10 отличиями и менее было исключено по одному маркеру с наименьшим показателем доли пропущенных генотипов (genotype missing rate). После применения всех фильтров в анализе осталось 1580746 SNP-маркеров.

На основе метаданных были сформулированы следующие критерии включения в группу пациентов с ДФ: возраст 47 лет и старше; кератопластика не менее, чем на одном глазу, или наличие 2-й или выше степени развития заболевания по модифицированной шкале Krachmer J., манифестировавшего не менее чем на одном глазу.

Критерии включения в группу контроля: возраст 60 лет и старше; нормальное развитие роговицы глаза (без зафиксированных в метаданных аномалий в состояниях эпителия, эндотелия и стромы), за исключением травм роговицы.

Критерии исключения: образцы с ошибками менделевского наследования; образцы с несовпадениями между заявленным полом и полом, установленным на основе генетических данных (по гетерозиготности X-хромосомы с одновременным обнаружением вариантов Y-хромосомы по данным PLINK); образцы с отсутствием более 5% генотипов; родственные образцы до второй линии родства включительно (по данным GRAF-rel).

С целью получения генетически однородной выборки в популяционном приближении с использованием GRAF-ror была проведена оценка популяции образцов. Были отфильтрованы образцы, являющиеся выбросами в пространстве генетических координат. Участники исследований были рекрутированы на базе нескольких научных центров, использующих разные критерии включения участников в выборку пациентов с ДФ и в контрольную выборку. Чтобы унифицировать данные критерии, мы дополнительно провели фильтрацию образцов по фенотипическим признакам, руководствуясь единой для всех образцов логикой формирования групп сравнения.

Далее разбиение пациентов на подгруппы с предполагаемым наличием или отсутствием экспансии повторов осуществляли в несколько этапов:

1-й этап: ранжирование и отсечение наиболее значимых вариантов локуса;

2-й этап: кластеризация участников исследования по гаплотипам/комбинациям отобранных вариантов;

3-й этап: проверка соответствия полученного результата доле вероятного носительства экспансии повторов по данным, известным из публикаций. Аллель повторов считали экспансированной, если число повторов составляло более 40 копий, и не экспансированной, если число повторов было менее 40.

Для реализации первого этапа был проведен полногеномный поиск ассоциаций с использованием модели логистической регрессии с добавлением пола и первых шести главных компонент в качестве ковариат. Значения p -value были скорректированы на множественное тестирование методом Бенджамини–Хохберга по FDR. Набор вариантов из 18 хромосомы (где расположен локус с повторами) сначала был отфильтрован по p -value $< 1 \times 10^{-15}$. Для сравнения с гаплотипным подходом из полученного набора вариантов были рассмотрены три SNP с самыми низкими значениями p -value в качестве возможных маркеров увеличенного числа повторов. Затем все варианты локуса были проведены через процедуру прунинга — сокращения числа анализируемых вариантов путем удаления высокоскоррелированных вариантов с попарной корреляцией: $r^2 > 0,6$. Матрица генотипов перед дальнейшим анализом была закодирована в соответствии с доминантной моделью наследования.

На втором этапе использовали предположение, что пациенты с экспансией повторов в гене TCF4 будут обладать определенным набором SNP. Мы ожидали, что образцы ДФ из анализируемого сета сгруппируются в локусе гена TCF4 на основании гаплотипов и комбинаций одиночных вариантов. При этом люди с фенокопией, обусловленной экспансией, на основании сходства комбинаций минорных вариантов попадут в общие кластеры. В эти же кластеры попадут люди из контрольной выборки, которые являются бессимптомными носителями повторов (2–10%), а также небольшая часть контрольной выборки, несущая минорные гаплотипы, не содержащие повторов. При этом комбинации мажорных вариантов и гаплотипы с преимущественно мажорными вариантами сформируют кластеры преимущественно из представителей контрольной выборки. Но сюда попадет и часть пациентов с ДФ с фенокопией без экспансии повторов, и часть пациентов с экспансией, более не сцепленной с минорными гаплотипами (у 7% пациентов с ДФ частично гаплотипы расцепляются с повторами, что ранее было показано для варианта rs613872 [23]). Поэтому доля пациентов с ДФ и участников без ДФ может быть использована как суррогатный маркер носительства повторов в конкретных кластерах.

Для разделения пациентов на группы к выборке был применен метод иерархической агломерационной кластеризации, реализованный в функции hclust пакета stats. Данный алгоритм выстраивает данные в древовидную структуру, последовательно объединяя пары кластеров с наименьшим расстоянием до тех пор, пока все элементы не будут объединены в один кластер. Алгоритм принимает на вход матрицу попарных расстояний между точками (образцами), на начальном этапе каждая точка представляет отдельный кластер. Из-за неидентичности гаплотипов мы ожидаем больше двух кластеров, а оптимальное их количество определяется метрикой Silhouette.

Таблица 1. Характеристика участников исследования

	Пациенты с ДФ	Контрольные образцы	
Выборка	По данным: Afshari et al, 2017	По данным: Afshari et al, 2017	По данным: ARED
Число участников	1287	2373	
		562	1811
Мужчины	408	989	
		245	744
Женщины	879	1384	
		317	1067
Медианный возраст	71	72	68
		69	

Для каждого кластера были определены доли пациентов и контрольных образцов. Кластеры с преобладанием доли пациентов мы считали ассоциированными с экспансией повторов. Дополнительно мы визуализировали входные данные с помощью тепловых карт, отображая распределение образцов в каждом кластере в качестве графических аннотаций.

Для подобранных трех SNP носительство минорного аллеля по группе контролей считали маркером носительства увеличенного числа повторов.

Для подтверждения правильности полученного разбиения было вычислено отношение шансов обнаружить экспансию в группе пациентов с ДФ по сравнению с группой контроля. Для отношения шансов был дополнительно рассчитан 95%-й доверительный интервал.

Для сравнения с экспериментальными данными нами был проведен подбор исследований по следующим критериям.

В исследовании методом фрагментного анализа или ПЦР с праймированием триплетов определяли число повторов в интроне гена *TCF4*.

Исследовали выборку людей европейского происхождения.

Число исследованных людей в группе больных ДФ или в группе контроля — не менее 50 человек.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После реализации процедуры контроля качества была сформирована комбинированная рабочая выборка из 3660 образцов европейского происхождения (табл. 1).

После применения всех фильтров в анализе осталось 1 580 746 SNP-маркеров.

Так как GWAS был проведен на тех же наборах данных, что были использованы в исследовании Afshari et al, 2017 [10], его результаты (рис. 1) сопоставимы с результатами, описанными в статье. Коэффициент генетической инфляции составил 1.05, что свидетельствует о незначительном расслоении населения.

Для дальнейшего анализа рассматривали только локус 18-й хромосомы. В результате фильтрации вариантов по значениям p -value осталось 134 варианта, из которых три имеют наиболее низкие значения p -value: rs784257, rs72932578 и rs618869 (и частоты минорных аллелей C, T и C в европейской популяции по данным проекта gnomAD v3.1.2, равны 0,17932, 0,05649 и 0,13451 соответственно) и были дополнительно проанализированы на предмет разделения пациентов на группы.

Размер гаплотипного блока составил 50 вариантов, оставшихся после процедуры прунинга. В результате кластеризации образцы были распределены по 10 подгруппам (рис. 2). Из них в трех подгруппах преобладали образцы пациентов с ДФ, в семи подгруппах преобладали образцы контрольной группы.

Результаты кластеризации показали, что кластеры с преобладанием людей контрольной группы гомогенны по их представленности. Однако три кластера с потенциально увеличенным числом повторов (с преобладанием пациентов с дистрофией Фукса) гетерогенны по гаплотипам, что отражено в неравномерности распределения людей с разными фенотипами в рамках каждого кластера. Это

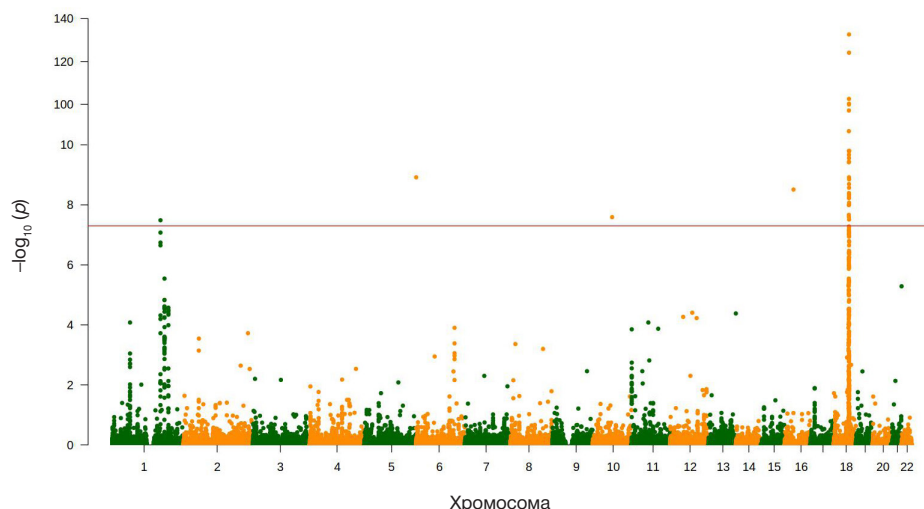


Рис. 1. Результаты полногеномного поиска ассоциаций, представленные с помощью Манхэттенского графика. Точки на графике представляют собой анализируемые варианты, их позиции по оси x определяются расположением вариантов в геноме, позиции по оси y отражают степень ассоциации с заболеванием, выраженную величиной $-\log_{10}(p\text{-value})$

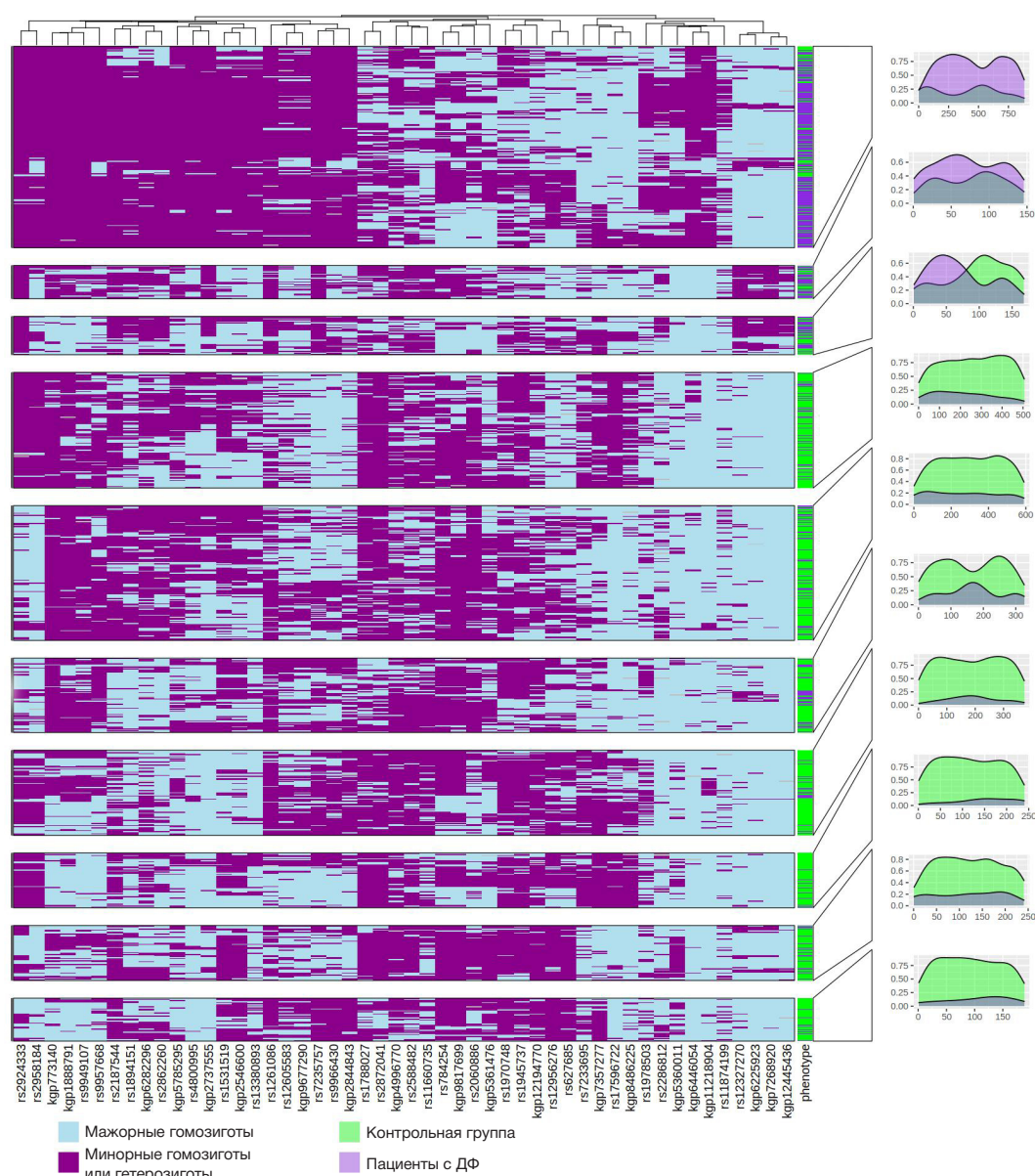


Рис. 2. Тепловая карта (хитмап) кластеризации пациентов. По вертикали обозначены пациенты, по горизонтали — различные геномные варианты. Аннотация справа отражает распределение образцов с ДФ и образцов контрольной группы в пределах каждого кластера

может быть связано как с бессимптомным носительством увеличенного числа повторов в данном локусе, так и с разрешающей способностью популяционных вариантов чипа, недостаточной для аккуратного разделения образцов по повторам разной длины.

Наш анализ показал, что доля людей из кластеров с предположительным носительством экспансированных повторов в группе образцов с ДФ значительно выше, чем

в контрольной группе (табл. 2). При этом рассчитанная доля людей с предположительным носительством экспансии повторов сильно варьирует в зависимости от выбора метода — предсказание экспансии по гаплотипам/комбинациям вариантов или по генотипам отдельных вариантов с низкими показателями p -value).

Для проверки полученных результатов нами был проведен подбор исследований с результатами

Таблица 2. Распределение людей с предположенным статусом повторов по группам сравнения

Маркер увеличенного числа повторов	Пациенты с ДФ			Контрольная выборка		
	С предсказанной экспансией повторов	С предсказанным отсутствием экспансии повторов	Доля предсказанных носителей экспансии повторов, %	С предсказанной экспансией повторов	С предсказанным отсутствием экспансии повторов	Доля предсказанных носителей экспансии повторов, %
Группа кластеров	764	523	59,4	264	2109	11,1
rs784257	1046	237	81,5	765	1602	32,3
rs72932578	698	583	54,5	286	2082	12,1
rs618869	852	431	66,4	588	1780	24,8

Таблица 3. Результаты экспериментальных исследований доли людей с экспансией повторов в *TCF4* среди пациентов с ДФ и контрольных образцов европейского происхождения

	Страна	ДФ		Контрольная группа	
		Всего	С экспансией повторов	Всего	С экспансией повторов
Skorodumova et al, 2018 [15]	Россия	100	72	100	5
Viberg et al., 2022 [24]	Швеция	85	76	102	4
Foja et al., 2017 [25]	Германия	61	47	113	13
Kuot et al., 2017 [26]	Австралия	189	107	183	9

экспериментального определения экспансии повторов. Традиционно число повторов определяют каноническим фрагментным анализом или ПЦР с праймированием триплетов с последующим фрагментным анализом. Было подобрано пять публикаций с подходящими выборками (табл. 3).

Для сравнения предсказанной частоты носительства экспансии с частотой носительства экспансии в исследованиях было проведено объединение выборок из публикаций. Сравнительный анализ показал, что маркеры в разной степени воспроизводят частоту носительства экспансии повторов в группах сравнения (рис. 3).

Ни один из использованных подходов не отражает с достаточной точностью частоту повторов в группе пациентов и контрольной группе по сравнению с результатами прямого типирования из статей (табл. 4). Однако гаплотипный подход превзошел анализируемые одиночные варианты по параметру отношения шансов, перекрывая 95% доверительный интервал выборки двух исследований.

Интересно отметить, что рассмотренные нами одиночные варианты дают сильно дискордантные между собой результаты (рис. 4), т. е. во многом разные люди являются носителями минорных аллелей в данных вариантах, что делает неустойчивой используемую метрику. rs784257 сильнее всего отличается по носительству аллелей от гаплотипного подхода и одновременно является наиболее значимым по результатам GWAS. При этом он показывает максимальное несоответствие по долям потенциального носительства экспансии в группе контроля и не лучшее соответствие с группой ДФ. Скорее всего данный аллель менее сцеплен с носительством повторов, чем два других.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Молекулярно-генетическая классификация пациентов с полигенными заболеваниями является полезным инструментом для изучения генетической природы заболеваний. При этом в рамках одного фенотипа могут существовать пациенты с группами каузальных вариантов, сцепленных с разными гаплотипами. И хотя ген явно связан с заболеванием, *p*-value вариантов будет выше из-за обилия групп сцепленных вариантов, т. е. из-за особенностей генетической структуры заболевания варианты, значимые для каждой из групп в отдельности, не преодолевают общепринятый критерий значимости (*p*-value $< 5 \times 10^{-8}$). К тому же для многих локусов, приближающихся по значимости к общепринятому порогу, характерна заметная разреженность по вариантам в области низких значений *p*-value, при которой только единичные варианты показывают сильные ассоциации с заболеванием. Таким образом, без дополнительного анализа не представляется возможным выбрать между отнесением геномных вариантов к популяционным выбросам (значимость которых обусловлена случайным популяционным смещением частот) или к потенциально значимой группе вариантов. Поэтому методы структуризации генетических данных, включающие анализ взаимодействий как вариантов в блоках гаплотипов, так и гаплотипных блоков между собой, являются перспективным инструментом для уточнения генетики заболевания.

GWAS позволяет получить больше информации о генетической структуре заболевания, чем исключение вариантов по *p*-value и формирование локусов с привязкой к ближайшему гену и по сути переходом с

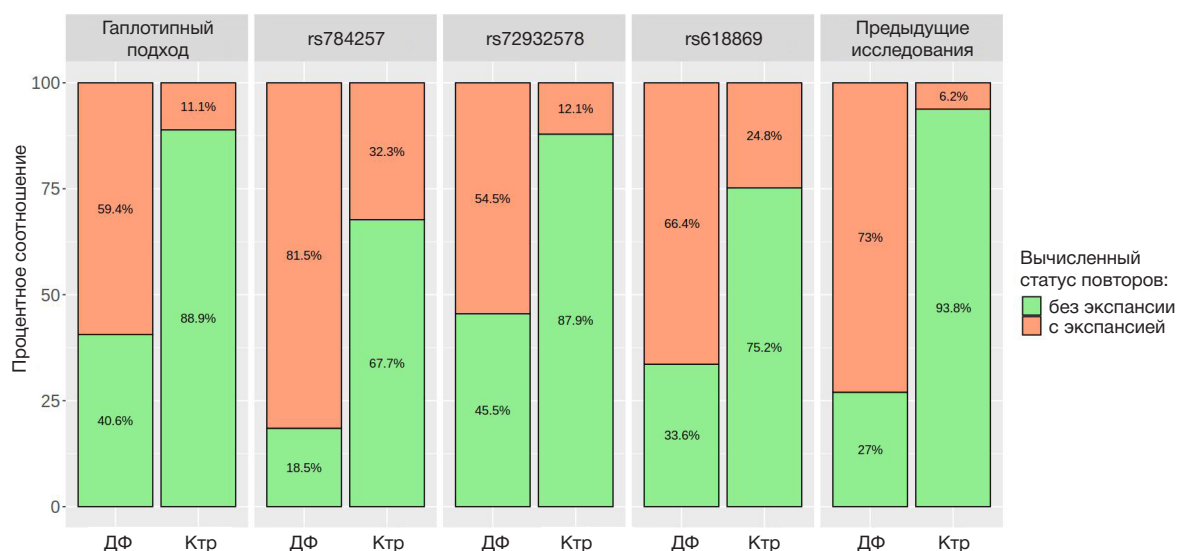


Рис. 3. Доля людей с экспансией и без экспансии повторов в интроне гена *TCF4* по данным нашего исследования (гаплотипный подход, носительство минорных аллелей вариантов rs784257, rs72932578, rs618869) и других исследований. ДФ — люди с дистрофией Фукса, Ктр — группа контроля

Таблица 4. Отношение шансов обнаружить экспансию в группе пациентов с ДФ по сравнению с группой контроля

	Отношение шансов	95%-й доверительный интервал
Гаплотипный подход (h-clust)	11,67	9,85–13,83
rs784257	9,24	7,83–10,90
rs72932578	8,72	7,39–10,28
rs618869	5,98	5,16–6,94
Skorodumova et al, 2018 [15]	48,86	17,98–132,76
Viberg et al., 2022 [24]	206,89	61,37–697,50
Foja et al., 2017 [25]	25,82	11,25–59,26
Kuot et al., 2017 [26]	25,23	12,17–52,31

уровня «вариант» на уровень «ген». При этом остаются вопросы о неравноценности вклада разных локусов в генетическую природу заболевания у конкретных групп людей с одним фенотипом. Это связано в том числе с отсутствием развитых подходов к формированию комбинаций вариантов, т. е. к работе на промежуточном уровне между уровнями «ген» и «вариант». Из-за неполной сцепленности вариантов между собой целесообразно рассматривать совокупности гаплотипов/комбинаций вариантов, определяющие дифференцированный риск заболевания, а не конкретные рисковые или протективные гаплотипы в отдельности, т. е. вариант с самым высоким популяционным атрибутивным риском (сочетание частоты аллелей и относительного риска), вероятно, и будет самым значимым в локусе.

До сих пор анализ групп гаплотипов, сцепленных с каузальными вариантами, является сложной задачей, однако все чаще превосходит методологию GWAS, даже несмотря на отсутствие высокопроизводительного единого подхода. В 2005 г. в результате GWAS было показано, что ген *CFH* ассоциирован с возрастной макулодистрофией сетчатки [27]. А позже появилось сообщение, что эта ассоциация не ограничивается одиночными вариантами, и видна в том числе в группах пациентов со структурными перестройками, в частности с частичными делециями генов *CFHR1-5* [27]. Более того, было выявлено, что большая часть вариативности, которую приписывали одиночным вариантам, на самом деле являлась маркером гаплотипов с крупными структурными перестройками в этом регионе. И именно гаплотипные варианты структуры локуса, в том числе с разной популяционной представленностью, уже имеют намного более сильную связь с риском дегенерации сетчатки, чем большинство одиночных вариантов в этом локусе [28].

В данной работе мы реализовали кластеризацию образцов по вариантам региона с экспансией, опираясь на данные об ассоциации с повторами отдельных вариантов [14, 23, 29], в частности, аллеля G варианта rs613872, и гаплотипных блоков [29]. В результате кластеризации образцы из группы пациентов с ДФ и контрольной группы оказались неравномерно распределены по кластерам, что является косвенным свидетельством кластеризации по гаплотипам, сцепленным с экспансией. Все кластеры за исключением одного (кластера № 3), обладали однозначным статусом. Неопределенность при выявлении статуса была обусловлена равным соотношением в кластере долей пациентов и лиц контроля. В дальнейшем предстоит принять решение, что делать с такими кластерами — перекластеризовать людей из них отдельно или оставлять с неопределенным статусом. Необходимо также подобрать другую метрику качества кластеризации, а для этого нужны дополнительные данные, содержащие одновременно и результаты генотипирования образцов, и информацию о длине повторов. Несмотря на данные ограничения, результаты, полученные с использованием гаплотипного подхода, превзошли результаты, показанные одиночными вариантами, однако оказались недостаточно точными, чтобы считать использованную нами реализацию оптимальной.

Данная работа позволила реализовать две цели.

1. Первичное тестирование подхода, позволяющего на промежуточном уровне (не уровне одиночного варианта и не уровне гена, ближайшего к локусу) выполнить стратификацию пациентов и групп контроля без предварительного понимания структуры гаплотипов локуса. В качестве меры использована доля пациентов с ДФ и контрольных образцов в кластерах, что позволяет использовать данный подход для заболеваний, у которых

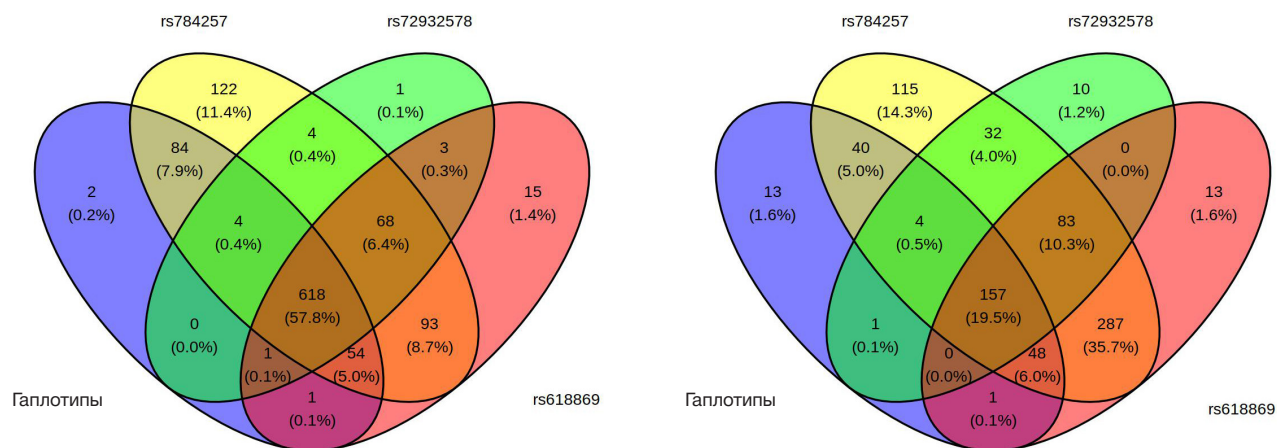


Рис. 4. Согласованность результатов определения статуса повторов с использованием разных подходов — по генотипам вариантов rs784257, rs72932578, rs618869 и с учетом гаплотипов. Слева — для носителей экспансии повторов в группе ДФ, справа — для носителей экспансии повторов в группе контроля

заведомо неизвестна ориентировочная доля людей с фенотипом, тесно связанная с данным локусом или обусловленная изменениями в нем.

2. Получить подвыборку пациентов с ДФ без носительства экспансии для прицельного переанализа GWAS с целью прояснения генетической структуры именно этой категории пациентов.

В будущем, кластеризация пациентов позволит не только выделять группы внутри фенотипа с сильным генетическим вкладом отдельных генетических вариантов, в том числе структурных, но и предлагать их обоснование и подходы к предсказанию ответа пациентов к разным видам терапии.

ВЫВОДЫ

В данном исследовании была продемонстрирована возможность применения подхода, основанного на гаплотипах, к молекулярно-генетической классификации

пациентов по причинам генетического заболевания, в данном случае, по наличию экспансии повторов. Результаты работы позволили нам сформулировать следующие выводы: 1) гаплотипный подход лучше, чем отдельные варианты, подходит для выявления связи локусов с отдельными группами пациентов; 2) для получения более точной картины следует пересмотреть подход к определению гаплотипного состава и моделированию матрицы данных для кластеризации. В частности планируется проанализировать ряд методов по вычислению генетического сходства (генетических расстояний) между образцами, а также применить более специфичные методы для начального отбора вариантов; 3) полученные результаты указывают на то, что кластеризация разделяет пациентов с ДФ и группу контроля с учетом групп гаплотипов/комбинаций вариантов, ассоциированных с экспансией повторов. Для дальнейших этапов тестирования подхода необходима дополнительная доказательная база, требующая подключения большего объема валидационных данных.

Литература

1. Uffelmann E, Huang QQ, Munung NS, De Vries J, Okada Y, Martin AR, et al. Genome-wide association studies. *Nature Reviews Methods Primers*. 2021; 1 (1): 59. Available from: <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00056-9>.
2. Lewis CM, Vassos E. Polygenic risk scores: from research tools to clinical instruments. *Genome medicine*. 2020; 12 (1): 1–1. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00742-5>.
3. Stram DO. Multi-SNP haplotype analysis methods for association analysis. *Statistical Human Genetics: Methods and Protocols*. 2017: 485–504. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7274-6_24.
4. Twestromwe D, Wright GE, Drögemöller BI, da Rocha J, Lombard Z, Hazellhurst S. A systematic comparison of pharmacogene star allele calling bioinformatics algorithms: a focus on CYP2D6 genotyping. *NPJ genomic medicine*. 2020; 5 (1): 30. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41525-020-0135-2>.
5. Van Rheenen W, Van Der Spek RA, Bakker MK, Van Vugt JJ, Hop PJ, Zwamborn RA, et al. Common and rare variant association analyses in amyotrophic lateral sclerosis identify 15 risk loci with distinct genetic architectures and neuron-specific biology. *Nature genetics*. 2021; 53 (12): 1636–48.
6. Lee JM, Wheeler VC, Chao MJ, Vonsattel JP, Pinto RM, Lucente D, et al. Identification of genetic factors that modify clinical onset of Huntington's disease. *Cell*. 2015; 162 (3): 516–26.
7. Fautsch MP, Wieben ED, Baratz KH, Bhattacharyya N, Sadan AN, Hafford-Tear NJ, et al. TCF4-mediated Fuchs endothelial corneal dystrophy: Insights into a common trinucleotide repeat-associated disease. *Progress in retinal and eye research*. 2021; 81: 100883.
8. Biswas S, Munier FL, Yardley J, Hart-Holden N, Perveen R, Cousin P, et al. Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the $\alpha 2$ chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Human molecular genetics*. 2001; 10 (21): 2415–23.
9. Wieben ED, Aleff RA, Tosakulwong N, Butz ML, Highsmith WE, Edwards AO, et al. A common trinucleotide repeat expansion within the transcription factor 4 (TCF4, E2-2) gene predicts Fuchs corneal dystrophy. *PLoS One*. 2012; 7 (11): e49083.
10. Afshari NA, Igo Jr RP, Morris NJ, Stambolian D, Sharma S, Pulagam VL, et al. Genome-wide association study identifies three novel loci in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Nature communications*. 2017; 8 (1): 14898.
11. Chung DW, Frausto RF, Ann LB, Jang MS, Aldave AJ. Functional impact of ZEB1 mutations associated with posterior polymorphous and Fuchs' endothelial corneal dystrophies. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014; 55 (10): 6159–66.
12. Chaurasia S, Ramappa M, Annapurna M, Kannabiran C. Coexistence of congenital hereditary endothelial dystrophy and Fuchs endothelial corneal dystrophy associated with SLC4A11 mutations in affected families. *Cornea*. 2020; 39 (3): 354–7.
13. Riazuddin SA, Vasanth S, Katsanis N, Gottsch JD. Mutations in AGBL1 cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy and alter protein-protein interaction with TCF4. *The American Journal of Human Genetics*. 2013; 93 (4): 758–64.
14. Riazuddin SA, Parker DS, McGlumphy EJ, Oh EC, Liff BW, Schmedt T, et al. Mutations in LOXHD1, a recessive-deafness locus, cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy. *The American Journal of Human Genetics*. 2012; 90 (3): 533–9.
15. Skorodumova LO, Belodedova AV, Antonova OP, Sharova EI, Akopian TA, Selezneva OV, et al. CTG18. 1 expansion is the best classifier of late-onset Fuchs' corneal dystrophy among 10 biomarkers in a cohort from the European part of Russia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2018; 59 (11): 4748–54.
16. Louttit MD, Kopplin LJ, Igo Jr RP, Fondran JR, Tagliaferri A, Bardenstein D, et al. A multi-center study to map genes for Fuchs' endothelial corneal dystrophy: baseline characteristics and heritability. *Cornea*. 2012; 31 (1): 26.
17. Age-Related Eye Disease Study Research Group. The age-related eye disease study (AREDS): design implications AREDS report no. 1. *Controlled clinical trials*. 1999; 20 (6): 573.
18. Stambolian D, Wojciechowski R, Oexle K, Pirastu M, Li X, Raffel LJ, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies in five cohorts reveals common variants in RBFOX1, a regulator of tissue-specific splicing, associated with refractive error. *Human molecular genetics*. 2013; 22 (13): 2754–64.
19. Krachmer JH, Purcell JJ Jr, Young CW, Bucher KD. Corneal endothelial dystrophy. A study of 64 families. *Arch Ophthalmol*. 1978; 96 (11): 2036–9. DOI: 10.1001/archophth.1978.03910060424004.
20. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*. 2015; 4: 7. DOI: 10.1186/s13742-015-0047-8.
21. Jin Y, Schäffer AA, Sherry ST, Feolo M. Quickly identifying identical and closely related subjects in large databases using genotype data. *PLoS One*. 2017; 12 (6): e0179106. DOI: 10.1371/journal.pone.0179106.
22. Jin Y, Schaffer AA, Feolo M, Holmes JB, Kattman BL. GRAF-pop: A Fast Distance-Based Method To Infer Subject Ancestry from Multiple Genotype Datasets Without Principal Components

- Analysis. G3 (Bethesda). 2019; 9 (8): 2447–61. DOI: 10.1534/g3.118.200925.
23. Okumura N, Hayashi R, Nakano M, Tashiro K, Yoshii K, Aleff R. et al. Association of rs613872 and Trinucleotide Repeat Expansion in the TCF4 Gene of German Patients With Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Cornea*. 2019; 38 (7): 799–805. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001952.
 24. Viberg A, Westin IM, Golovleva I, Byström B. TCF4 trinucleotide repeat expansion in Swedish cases with Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Acta Ophthalmol*. 2022; 100 (5): 541–8. DOI: 10.1111/aos.15032. Epub 2021 Oct 13.
 25. Foja S, Luther M, Hoffmann K, Rupprecht A, Gruenauer-Kloevekorn C. CTG18.1 repeat expansion may reduce TCF4 gene expression in corneal endothelial cells of German patients with Fuchs' dystrophy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017; 255 (8): 1621–31. DOI: 10.1007/s00417-017-3697-7. Epub 2017 Jun 12.
 26. Kuot A, Hewitt AW, Snibson GR, Souzeau E, Mills R, Craig JE, et al. TGC repeat expansion in the TCF4 gene increases the risk of Fuchs' endothelial corneal dystrophy in Australian cases. *PLoS One*. 2017; 12 (8): e0183719. DOI: 10.1371/journal.pone.0183719.
 27. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005; 308 (5720): 385–9. DOI: 10.1126/science.1109557. Epub 2005 Mar 10.
 28. Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, et al. Deletion of CFHR3 and CFHR1 genes in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2008; 17 (7): 971–7. DOI: 10.1093/hmg/ddm369. Epub 2007 Dec 15.
 29. Baratz KH, Tosakulwong N, Ryu E, Brown WL, Branham K, Chen W, et al. E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy. *N Engl J Med*. 2010; 363 (11): 1016–24. DOI: 10.1056/NEJMoa1007064. Epub 2010 Aug 25.
- ### References
1. Uffelmann E, Huang QQ, Munung NS, De Vries J, Okada Y, Martin AR, et al. Genome-wide association studies. *Nature Reviews Methods Primers*. 2021; 1 (1): 59. Available from: <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00056-9>.
 2. Lewis CM, Vassos E. Polygenic risk scores: from research tools to clinical instruments. *Genome medicine*. 2020; 12 (1): 1–1. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00742-5>.
 3. Stram DO. Multi-SNP haplotype analysis methods for association analysis. *Statistical Human Genetics: Methods and Protocols*. 2017: 485–504. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7274-6_24.
 4. Twesigomwe D, Wright GE, Drögemöller BI, da Rocha J, Lombard Z, Hazelhurst S. A systematic comparison of pharmacogene star allele calling bioinformatics algorithms: a focus on CYP2D6 genotyping. *NPJ genomic medicine*. 2020; 5 (1): 30. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41525-020-0135-2>.
 5. Van Rheenen W, Van Der Spek RA, Bakker MK, Van Vugt JJ, Hop PJ, Zwamborn RA, et al. Common and rare variant association analyses in amyotrophic lateral sclerosis identify 15 risk loci with distinct genetic architectures and neuron-specific biology. *Nature genetics*. 2021; 53 (12): 1636–48.
 6. Lee JM, Wheeler VC, Chao MJ, Vonsattel JP, Pinto RM, Lucente D, et al. Identification of genetic factors that modify clinical onset of Huntington's disease. *Cell*. 2015; 162 (3): 516–26.
 7. Fautsch MP, Wieben ED, Baratz KH, Bhattacharyya N, Sadan AN, Hafford-Tear NJ, et al. TCF4-mediated Fuchs endothelial corneal dystrophy: Insights into a common trinucleotide repeat-associated disease. *Progress in retinal and eye research*. 2021; 81: 100883.
 8. Biswas S, Munier FL, Yardley J, Hart-Holden N, Perveen R, Cousin P, et al. Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the $\alpha 2$ chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Human molecular genetics*. 2001; 10 (21): 2415–23.
 9. Wieben ED, Aleff RA, Tosakulwong N, Butz ML, Highsmith WE, Edwards AO, et al. A common trinucleotide repeat expansion within the transcription factor 4 (TCF4, E2-2) gene predicts Fuchs corneal dystrophy. *PLoS One*. 2012; 7 (11): e49083.
 10. Afshari NA, Igo Jr RP, Morris NJ, Stambolian D, Sharma S, Pulagam VL, et al. Genome-wide association study identifies three novel loci in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Nature communications*. 2017; 8 (1): 14898.
 11. Chung DW, Frausto RF, Ann LB, Jang MS, Aldave AJ. Functional impact of ZEB1 mutations associated with posterior polymorphous and Fuchs' endothelial corneal dystrophies. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014; 55 (10): 6159–66.
 12. Chaurasia S, Ramappa M, Annapurna M, Kannabiran C. Coexistence of congenital hereditary endothelial dystrophy and Fuchs endothelial corneal dystrophy associated with SLC4A11 mutations in affected families. *Cornea*. 2020; 39 (3): 354–7.
 13. Riazuddin SA, Vasanth S, Katsanis N, Gottsch JD. Mutations in AGBL1 cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy and alter protein-protein interaction with TCF4. *The American Journal of Human Genetics*. 2013; 93 (4): 758–64.
 14. Riazuddin SA, Parker DS, McGlumphy EJ, Oh EC, Iliff BW, Schmedt T, et al. Mutations in LOXHD1, a recessive-deafness locus, cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy. *The American Journal of Human Genetics*. 2012; 90 (3): 533–9.
 15. Skorodumova LO, Belodedova AV, Antonova OP, Sharova EI, Akopian TA, Selezneva OV, et al. CTG18.1 expansion is the best classifier of late-onset Fuchs' corneal dystrophy among 10 biomarkers in a cohort from the European part of Russia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2018; 59 (11): 4748–54.
 16. Louttit MD, Kopplin LJ, Igo Jr RP, Fondran JR, Tagliaferri A, Bardenstein D, et al. A multi-center study to map genes for Fuchs' endothelial corneal dystrophy: baseline characteristics and heritability. *Cornea*. 2012; 31 (1): 26.
 17. Age-Related Eye Disease Study Research Group. The age-related eye disease study (AREDS): design implications AREDS report no. 1. *Controlled clinical trials*. 1999; 20 (6): 573.
 18. Stambolian D, Wojciechowski R, Oxle K, Pirastu M, Li X, Raffel LJ, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies in five cohorts reveals common variants in RBFOX1, a regulator of tissue-specific splicing, associated with refractive error. *Human molecular genetics*. 2013; 22 (13): 2754–64.
 19. Krachmer JH, Purcell JJ Jr, Young CW, Bucher KD. Corneal endothelial dystrophy. A study of 64 families. *Arch Ophthalmol*. 1978; 96 (11): 2036–9. DOI: 10.1001/archophth.1978.03910060424004.
 20. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*. 2015; 4: 7. DOI: 10.1186/s13742-015-0047-8.
 21. Jin Y, Schäffer AA, Sherry ST, Feolo M. Quickly identifying identical and closely related subjects in large databases using genotype data. *PLoS One*. 2017; 12 (6): e0179106. DOI: 10.1371/journal.pone.0179106.
 22. Jin Y, Schaffer AA, Feolo M, Holmes JB, Kattman BL. GRAF-pop: A Fast Distance-Based Method To Infer Subject Ancestry from Multiple Genotype Datasets Without Principal Components Analysis. *G3 (Bethesda)*. 2019; 9 (8): 2447–61. DOI: 10.1534/g3.118.200925.
 23. Okumura N, Hayashi R, Nakano M, Tashiro K, Yoshii K, Aleff R. et al. Association of rs613872 and Trinucleotide Repeat Expansion in the TCF4 Gene of German Patients With Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Cornea*. 2019; 38 (7): 799–805. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001952.
 24. Viberg A, Westin IM, Golovleva I, Byström B. TCF4 trinucleotide repeat expansion in Swedish cases with Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Acta Ophthalmol*. 2022; 100 (5): 541–8. DOI: 10.1111/aos.15032. Epub 2021 Oct 13.
 25. Foja S, Luther M, Hoffmann K, Rupprecht A, Gruenauer-

- Kloevekorn C. CTG18.1 repeat expansion may reduce TCF4 gene expression in corneal endothelial cells of German patients with Fuchs' dystrophy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017; 255 (8): 1621–31. DOI: 10.1007/s00417-017-3697-7. Epub 2017 Jun 12.
26. Kuot A, Hewitt AW, Snibson GR, Souzeau E, Mills R, Craig JE, et al. TGC repeat expansion in the TCF4 gene increases the risk of Fuchs' endothelial corneal dystrophy in Australian cases. *PLoS One*. 2017; 12 (8): e0183719. DOI: 10.1371/journal.pone.0183719.
 27. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005; 308 (5720): 385–9. DOI: 10.1126/science.1109557. Epub 2005 Mar 10.
 28. Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, et al. Deletion of CFHR3 and CFHR1 genes in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2008; 17 (7): 971–7. DOI: 10.1093/hmg/ddm369. Epub 2007 Dec 15.
 29. Baratz KH, Tosakulwong N, Ryu E, Brown WL, Branham K, Chen W, et al. E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy. *N Engl J Med*. 2010; 363 (11): 1016–24. DOI: 10.1056/NEJMoa1007064. Epub 2010 Aug 25.

ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТАХ ПРИ ХРАНЕНИИ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

О. С. Роговая¹✉, Е. В. Алпеева¹, Е. С. Ручко¹, А. В. Еремеев^{1,2}, Е. А. Воротеляк¹

¹ Институт биологии развития имени Н. К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Биомедицинские клеточные продукты (БМКП) — дермальный эквивалент кожи (ДЭК) и биологический эквивалент кожи (БЭК) — это аллогенные эквиваленты дермы и кожи человека, применяемые для лечения в случаях критической потери кожи. Одним из важных вопросов разработки БМКП является подбор условий хранения, способствующих увеличению срока их годности для расширения возможностей логистики и использования. Целью исследования было определить срок годности ДЭК и БЭК путем оценки морфологии и жизнеспособности клеток в их составе и уровней секреции ими фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в процессе хранения в физиологическом растворе при комнатной температуре. Используя МТТ-тест и окраску витальным красителем, мы установили, что при хранении обоих видов БМКП в физиологическом растворе снижение жизнеспособности и метаболической активности клеток более чем на 50% происходило к 3–4 суткам хранения, причем в ДЭК быстрее, чем в БЭК. Морфология клеток, выделенных из ДЭК и БЭК после 3 суток хранения, оставалась неизменной. После помещения БМКП в физиологический раствор мезенхимные стволовые клетки в их составе продолжали синтезировать VEGF (показано методом ИФА), что может свидетельствовать о сохранении ими необходимой секреторной активности.

Ключевые слова: биомедицинский клеточный продукт, БМКП, эквивалент кожи, умеренная гипотермия, кератиноциты, МСК

Финансирование: исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

Вклад авторов: О. С. Роговая, А. В. Еремеев — проведение экспериментов, анализ данных; Е. В. Алпеева — интерпретация данных, анализ литературы; Е. С. Ручко — проведение экспериментов; Е. А. Воротеляк — планирование исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ИБР РАН (протокол № 51 от 09 сентября 2021 г.), проведено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации ВМА и ее последующих пересмотров.

✉ Для корреспонденции: Ольга Сергеевна Роговая
ул. Вавилова, д. 26, г. Москва, 119334, Россия; rogovaya26f@yandex.ru

Статья получена: 16.12.2022 **Статья принята к печати:** 15.01.2023 **Опубликована онлайн:** 30.01.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.003

SURVIVAL OF HUMAN CELLS IN TISSUE-ENGINEERED CONSTRUCTS STORED AT ROOM TEMPERATURE

Rogovaya OS¹✉, Alpeeva EV¹, Ruchko ES¹, Ereemeev AV^{1,2}, Vorotelyak EA¹

¹ Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Tissue-engineered constructs (TECs), the dermal equivalent (DE) and the skin equivalent (SE), are allogenic equivalents of the skin and derm used to treat critical skin loss. Selection of storage conditions that contribute to longer shelf life, thereby expanding the possibilities of logistics and use, is one of the major issues related to the TECs development. The study was aimed to determine the shelf life of the DE and SE TECs stored in normal saline at room temperature by assessing morphology and viability of the cells on their surface, along with the levels of endothelial growth factor (VEGF) secreted by these cells. Using the MTT assay and staining with vital dye, we discovered the following: when TECs of both types were stored in normal saline, the cells viability and metabolic activity decreased by more than 50% by days 3–4 of storage. Furthermore, these decreased faster in DEs than in SEs. Morphology of the cells isolated from DEs and SEs after the 3-day storage remained unchanged. Mesenchymal stem cells on the surface of TECs kept producing VEGF after TECs culture medium was changed for saline solution (confirmed by immunofluorescence assay), which could indicate that the cells retained essential secretory activity.

Keywords: tissue-engineered construct, TEC, skin equivalent, mild hypothermia, keratinocytes, MSCs

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Agreement № 075-15-2021-1063 of 28.09.2021.

Author contribution: Rogovaya OS, Ereemeev AV — experimental procedure, data analysis; Alpeeva EV — data interpretation, literature review; Ruchko ES — experimental procedure; Vorotelyak EA — study planning.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Koltzov Institute of Developmental Biology, RAS (protocol № 51 of 09 September 2021) and conducted in accordance with the principles of the WMA Declaration of Helsinki and its subsequent revisions.

✉ Correspondence should be addressed: Olga S. Rogovaya
Vavilova, 26, Moscow, 119334, Russia; rogovaya26f@yandex.ru

Received: 16.12.2022 **Accepted:** 15.01.2023 **Published online:** 30.01.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.003

Исследуемые в данной работе биомедицинские клеточные продукты (БМКП) — дермальный эквивалент кожи (ДЭК) и биологический эквивалент кожи (БЭК), представляют собой трехмерные эквиваленты кожи и дермы, содержащие в своем составе живые клетки, культивируемые на поверхности биосовместимых матриц. Одним из недостатков БМКП подобного типа

является низкая выживаемость клеточного компонента при их замораживании и короткий срок годности при положительных температурах, что ограничивает их логистику и применение. Для внедрения БМКП в широкую клиническую практику необходимо найти баланс, при котором препарат, с одной стороны, не будет требовать трудновыполнимых технических условий хранения, а с

другой стороны, будет соответствовать таким критериям, как функциональная активность и достаточно высокая жизнеспособность клеточного компонента к моменту трансплантации. Разработка надежного способа хранения БМКП без ксенобиотиков будет способствовать широкому их распространению в трансплантационной медицине. Кроме того, достаточный срок хранения готовых клеточных продуктов обеспечит расширенные возможности для контроля их качества перед применением [1].

Несмотря на то что сообщалось об успешном сохранении простых тканеинженерных конструкторов в замороженном состоянии, в случае 3D-систем на основе клеток и матриксов жизнеспособность клеточного компонента после оттаивания обычно составляет не более 50% [2–4]. Такие показатели жизнеспособности недостаточны для достижения оптимальных терапевтических результатов. В то же время существует информация об успешном хранении полнослойных кожных трансплантатов при низких положительных температурах в простых солевых растворах [5, 6].

Эти данные в сочетании с необходимостью использования сложных режимов замораживания/оттаивания, применения специального оборудования и методов отмывания БМКП от криосреды перед использованием дают основание считать разработку протоколов хранения БМКП до трансплантации при положительных температурах весьма перспективной.

Известно, что диапазон положительных температур, позволяющий сохранять клетки без значительной потери жизнеспособности, лежит в интервале от +4 до +37 °C, причем тенденции к сохранению жизнеспособности различаются между +5 и +25 °C. Так, в гепатоцитах крысы при температуре ниже +16 °C начинает происходить гипотермическое повреждение и достигает максимума при +4–+8 °C [7]. Ранее было продемонстрировано, что клетки человека могут сохранять до 90% жизнеспособности при низких положительных температурах в изотонических растворах в течение 30 ч [8]. Существуют данные о том, что мезенхимные стволовые клетки жировой ткани (МСК ЖТ) сохраняют все свои свойства при хранении в солевых растворах при комнатной температуре [9]. Также был предложен способ хранения трансплантатов на основе МСК в умеренно гипотермических условиях, являющийся альтернативной стратегией краткосрочной консервации трансплантатов. Ранее авторы показали, что при +25 °C жизнеспособность МСК в составе БМКП была значительно выше, чем при +4 °C [10].

С учетом вышеизложенного для настоящего исследования была выбрана температура хранения образцов +22 °C. Стабильность БМКП ДЭК и БЭК оценивали в течение трех суток по следующим признакам: целостность и цвет образца, объем, цвет и прозрачность жидкости в чашке с образцом, стерильность образца, количество живых клеток в составе образца, их метаболическая и секреторная активность. БМКП ДЭК был сконструирован на основе биосовместимой матрицы из гиалуроновой кислоты и коллагена 1-го типа и клеточного компонента — МСК ЖТ. БМКП БЭК был сконструирован на основе биосовместимой матрицы из гиалуроновой кислоты и коллагена 1-го типа и клеточного компонента — МСК ЖТ и кератиноцитов кожи. Целью работы было определить сроки хранения готовых БМКП ДЭК и БЭК при комнатной температуре, отвечающие условию сохранения секреторных свойств клеток, входящих в их состав, и высокого уровня их жизнеспособности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили в лаборатории. Все процедуры культивирования и переноса клеточных культур на биополимерные матрицы проводили в асептических условиях.

Изготовление и хранение БМКП

Для изготовления БМКП использовали клетки человека из Коллекции клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления) (ИБР РАН, Москва, Россия). МСК ЖТ и кератиноциты были получены из биоптатов кожи взрослых здоровых доноров (возраст 40–70 лет).

В качестве матрицы для роста клеток при культивировании БМКП использовали гистоеквивалент — биопластический материал G-DERM (Джи ДERM) («ДЖИ-Групп»; Россия), произведенный из гиалуроновой кислоты и коллагена 1-го типа.

Размораживание и культивирование клеток

Криопробирки с клетками (количество клеток в пробирке — 1×10^6) изымали из криохранилища, размораживали при +37 °C и центрифугировали при 200 g, после чего супернатант сливали, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде и переносили в культуральные флаконы T25 (SPL; Корея).

Для МСК ЖТ использовали культуральную среду α -MEM («ПанЭко»; Россия) с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) (Hyclon; США), 1% Glutamax (Gibco; США) и 1% PenStrep (Gibco; США). Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при +37 °C, 5% CO₂ и повышенной влажности. Каждые двое суток проводили полную замену среды, при достижении клетками 80% конфлуэнтного монослоя их пассировали. Пассирование проводили по следующей схеме: культуральную среду сливали, клетки однократно промывали раствором Версена («ПанЭко»; Россия), затем во флакон вносили 800 мкл 0,05%-го раствора трипсина (Gibco; США) и инкубировали при +37 °C 5–10 мин до полного округления и открепления клеток от дна. Трипсин ингибировали культуральной средой, полученную клеточную суспензию пипетировали и пересеивали в новые флаконы в соотношении 1 : 3.

Для кератиноцитов использовали культуральную среду DMEM/F12 («ПанЭко»; Россия) с добавлением 10% ЭБС (Hyclon; США), 10 нг/мл эпидермального фактора роста EGF (Sigma; США), 1% Glutamax (Gibco; США), 1% PenStrep (Gibco; США) и 1% ITS (Gibco; США). Клетки культивировали так же, как описано выше для МСК ЖТ.

Изготовление БМКП ДЭК и БЭК

Биосовместимую матрицу для БМКП готовили следующим образом: из сухой пластины Джи ДERM вырезали кусок 6 × 6 см, помещали его в культуральную чашку Петри диаметром 10 см, добавляли в нее 10 мл культуральной среды и оставляли пластину в среде для набухания на 2 ч.

Для изготовления ДЭК использовали МСК ЖТ 6–8 пассажей. Клетки снимали с культуральных флаконов при помощи раствора Версена и трипсина так, как это описано выше, центрифугировали при 300 g и ресуспендировали клеточный осадок в культуральной среде (для МСК ЖТ

в концентрации 3×10^5 кл./мл). МСК ЖТ в суспензии наносили на подготовленную биосовместимую матрицу из расчета 3 мл клеточной суспензии на один ДЭК. Через 2 ч после посева клеток объем среды в чашке с матрицей доводили до 10 мл и инкубировали полученный эквивалент в CO₂-инкубаторе в течение трех суток.

При изготовлении БЭК использовали два типа клеток: МСК ЖТ 6–8 пассажей и кератиноциты кожи 1–2 пассажей. На первом этапе на матрицу наносили МСК ЖТ так, как это описано выше. Через 2 ч после посева МСК ЖТ на нее высевали второй тип клеток — кератиноциты. Для этого кератиноциты снимали с культурального флакона, центрифугировали при 300 g и ресуспендировали клеточный осадок в культуральной среде для кератиноцитов. Клеточную суспензию заливали в чашку Петри с подготовленной ранее матрицей с МСК ЖТ, исходя из соотношения 1×10^5 кл./см². После этого полученный БМКП инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение трех суток.

Хранение БМКП

В сформированных ДЭК и БЭК культуральную среду удаляли, БМКП дважды промывали DPBS («ПанЭко»; Россия), после чего в каждую чашку с БМКП добавляли по 10 мл стерильного физиологического раствора и упаковывали чашки в вакуумные пакеты. Полученные таким образом готовые БМКП помещали на хранение в термостат при температуре +22 °C в течение пяти суток, ежедневно изымая часть образцов для проведения анализа.

Визуальная оценка качества образца после хранения

Целостность, изменение цвета образца, объем, цвет и прозрачность жидкости в чашке с образцом, стерильность образца оценивали при изъятии их с хранения перед проведением последующих анализов состояния клеточного компонента. Для этого упаковки с образцами переносили в ламинар, где вторичную упаковку (вакуумный пакет) вскрывали, открывали чашку Петри, пипеткой отбирали физиологический раствор, в котором хранился образец, измеряли объем жидкости и переносили его в новую чашку. Состояние физиологического раствора проверяли при помощи инвертированного микроскопа Olympus IX73 с камерой Olympus DP74 (Olympus; Япония) при увеличении $\times 200$ и $\times 400$ для выявления признаков контаминации. Сам образец осматривали, при помощи пинцетов проверяли его целостность, после чего проводили дальнейшие исследования жизнеспособности и функциональной активности клеточного компонента.

Оценка способности клеток к адгезии и образованию культур после нахождения в составе БМКП

Выделение клеток из БМКП проводили после этапа хранения. Образцы промывали раствором Версена («ПанЭко»; Россия), после чего добавляли к ним 3 мл 0,25% раствора трипсина («ПанЭко»; Россия) и оставляли для ферментации на 10 мин при +37 °C при интенсивном покачивании. Затем трипсин ингибировали равным объемом культуральной среды с добавлением 10% ЭБС и дополнительно пипетировали, для того чтобы смыть максимальное количество клеток с поверхности матрицы. После чего полученную суспензию центрифугировали

5 мин при 200 g, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в культуральной среде и высевали на культуральные чашки Петри. Через сутки клетки визуализировали и фотографировали при помощи инвертированного микроскопа Olympus IX73 с камерой Olympus DP74 (Olympus; Япония).

Оценка метаболической активности клеток в составе БМКП с помощью МТТ-теста

Для оценки метаболической активности в каждой временной точке хранения БМКП доставали из упаковки, разрезали на фрагменты 1×1 см и помещали в отдельные лунки 24-луночного планшета. Затем в лунки добавляли реагент МТТ (Sigma-Aldrich; США) в конечной концентрации 30 мкг/мл и инкубировали в течение 2,5 ч. После инкубации отбирали среду и добавляли в каждую лунку по 180 мкл ДМСО («ПанЭко»; Россия), помещали планшет на шейкер, через 1 мин отбирали окрашенный раствор и вносили его в 96-луночный планшет по 60 мкл в лунку для измерения оптической плотности. Оптическую плотность раствора измеряли при помощи фотометра Stat Fax 2100 (Awareness Technology; США) при длине волны 530 нм.

Выявление жизнеспособных клеток в составе БМКП

Для выявления жизнеспособных и погибших клеток в составе БМКП, прошедших процедуру хранения, образцы окрашивали витальным интеркалирующим красителем кальцеином Calcein AM (кальцеин) (1 мкМ) (Sigma; США) в соответствии с рекомендациями производителя. Окрашивание БМКП проводили в условиях CO₂-инкубатора (+37 °C, 5% CO₂) в течение 30 мин. Метод окрашивания основан на действии внутриклеточных эстераз, которые присутствуют исключительно в живых клетках и расщепляют данный краситель, в результате чего он начинает флуоресцировать в зеленой области спектра, в то время как в погибших клетках свечение не обнаруживается. Окрашенные образцы визуализировали и фотографировали при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IX73 с камерой Olympus DP74 (Olympus; Япония). Для определения процента живых клеток в составе БМКП использовали протокол программы Image J (LOCI, Университет Висконсина, США) с использованием открытого плагина [11], который вычисляет процент окрашенных кальцеином областей в поле зрения. После получения числовых значений в трех повторах эксперимента за 100% принимали данные, полученные от исходных образцов БМКП, культивируемых в CO₂-инкубаторе в течение трех суток.

Оценка секреторной активности БМКП методом иммуноферментного анализа VEGF в кондиционированной среде

Отбор проб при исследовании БМКП проводили при хранении на протяжении трех суток, ежедневно производя отбор проб физиологического раствора, в котором хранили образцы. Для этого упаковки с образцами переносили в ламинар, снимали вторичную упаковку и с соблюдением стерильности отбирали по 100 мкл жидкости из каждой чашки с БМКП. После отбора проб чашки повторно запечатывали и убрали в термостат для дальнейшего хранения. В качестве контроля

использовали исходные образцы БМКП в культуральной среде и МСК ЖТ той же линии и пассажа, что и клетки в составе исследуемой серии БМКП, высеванные в лунки 24-луночного планшета и культивируемые стандартным способом. В качестве контроля отбирали пробы ростовой среды до начала исследования и пробы среды, в которой инкубировали матрицу без клеток в те же сроки. Для работы использовали набор VEGF-ИФА-БЕСТ (А-8784) («Вектор-Бест»; Россия).

Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя. Спектрофотометрию анализируемых проб проводили при длине волны 450 нм на приборе xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad; США).

Вычисляли среднее значение оптической плотности (ОД) для пар лунок и строили калибровочный график зависимости ОД от концентрации VEGF (МЕ/мл) в линейных координатах. Исходя из графика определяли концентрацию контрольного и опытных образцов в МЕ/мл согласно рекомендациям производителя набора. Результаты анализа учитывали, если вычисленное значение контрольного образца по калибровочному графику совпадало с указанным на маркировке флакона из набора.

Статистические методы

Все эксперименты с БМКП проводили в трех биологических повторах, каждый отдельный эксперимент включал не менее трех технических повторностей. После получения числовых значений в экспериментах с вычислением процента жизнеспособных клеток и при анализе результатов МТТ-теста их нормировали на данные, полученные от исходных образцов. В программе Microsoft Excel (Microsoft Corporation; США) вычисляли среднее арифметическое и стандартное отклонение среднего.

Достоверность различий в группах проверяли с использованием теста ANOVA в программе Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При изъятии образцов с хранения при вскрытии вторичной упаковки все образцы визуально оставались сохранными: физиологический раствор, в котором хранили БМКП, оставался прозрачным, уменьшения его объема и контаминации микроорганизмами выявлено не было. Сами образцы на всем протяжении проводимых испытаний сохраняли свою целостность и первоначальный розовато-бежевый цвет.

Оценку жизнеспособности клеток в составе готовых культивируемых и запакованных БМКП, хранящихся при +22 °С, проводили двумя способами: при помощи окраски витальным красителем кальцеином и при помощи МТТ-теста.

Анализ показал, что число живых клеток уменьшается быстрее в БМКП ДЭК. Уже на вторые сутки в ДЭК наблюдали двукратное снижение количества кальцеин-положительных клеток (рис. 1), тогда как в БЭК их уменьшения не обнаружено (рис. 2). Кроме того, в обоих типах эквивалентов на третьи сутки наблюдали изменение морфологии МСК ЖТ: клетки, для которых в норме характерна веретеновидная форма, становились менее вытянутыми, часть клеток начинала открепляться от поверхности матрицы. При этом критическое снижение количества живых клеток в обоих БМКП — до 14% в ДЭК и 22,3% в БЭК (достоверность для каждого типа БМКП

подтверждена на уровне $p \leq 0,005$) — происходило на четвертые сутки хранения (рис. 1, 2).

В основе второго выбранного нами способа оценки состояния клеточного компонента в составе БМКП лежит измерение интенсивности образования кристаллов формазана в окружающей клетки среде под воздействием выделяемых ими метаболитов, коррелирующее с уровнем метаболизма, который принимается как отражение их жизнеспособности. Данный тест показал, что снижение метаболической активности происходит в ДЭК быстрее, чем в БЭК, поскольку на третьи сутки в ДЭК выявлено уменьшение метаболической активности до 44,6% относительно начала хранения ($p \leq 0,005$), в то время как в БЭК на третьи сутки она еще была на уровне 79,1% (достоверность отличий от исходного значения на данных сроках не значима), а к пятым суткам в ДЭК наблюдалось всего 18% первоначальной метаболической активности, и в БЭК ее значение достоверно падало до 33,7% ($p \leq 0,005$) (рис. 3А, Б).

При исследовании уровня VEGF, секретируемого клетками в физиологический раствор, в котором хранились образцы БМКП, во всех образцах физиологического раствора было выявлено наличие VEGF. Уровень данного фактора в растворе хранения к третьим суткам снижался незначительно (рис. 3В, Г). Так, в пробах раствора, в котором хранили ДЭК, в первые сутки выявили около 506 ± 136 МЕ/мл VEGF, а к третьим суткам — 493 ± 136 МЕ/мл (разница статистически не значима), а в пробах раствора, в котором хранили БЭК, в те же сроки — $1583,333 \pm 189$ МЕ/мл и 1733 ± 208 МЕ/мл соответственно (разница статистически не значима).

На третьи сутки из БМКП был выделен клеточный компонент. Как описано ранее, при создании ДЭК используют только один тип клеток — МСК, а при создании БЭК — два, МСК и кератиноциты, поэтому клетки, выделенные из ДЭК и БЭК, различались по морфологии и количеству. Все выделенные клетки показывали нормальную способность к адгезии. Они быстро прикреплялись к дну культуральной чашки, распластывались, приобретали стандартную морфологию (рис. 4А, В) и сохраняли ее весь период наблюдения (до четырех суток) (рис. 4Б, Г). Визуально количество прикрепившихся МСК ЖТ из БЭК значительно превышало их количество из ДЭК (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью исследования было определение сроков сохранения при комнатной температуре в функциональном и жизнеспособном состоянии клеточного компонента БМКП ДЭК и БЭК, разработанных в нашей лаборатории. Предыдущие наши исследования (неопубликованные данные) показали, что при хранении БМКП в замороженном виде при -70 °С и -20 °С с использованием различных криопротекторов (ДМСО, глицерин), специальных сред для замораживания чувствительных клеточных линий, Vambanker™ (Lymphotec; Япония), и многоклеточных объектов, Криодерм («ПанЭко»; Россия), клетки в их составе теряют жизнеспособность при размораживании. Значительное снижение их жизнеспособности в течение 24 ч было зарегистрировано также при температуре +4 °С. По данным литературы, для замораживания БМКП часто используют специальные коммерческие среды (например, Synth-a-Freeze™), тщательно разрабатывают протоколы замораживания/размораживания [4, 12, 13],

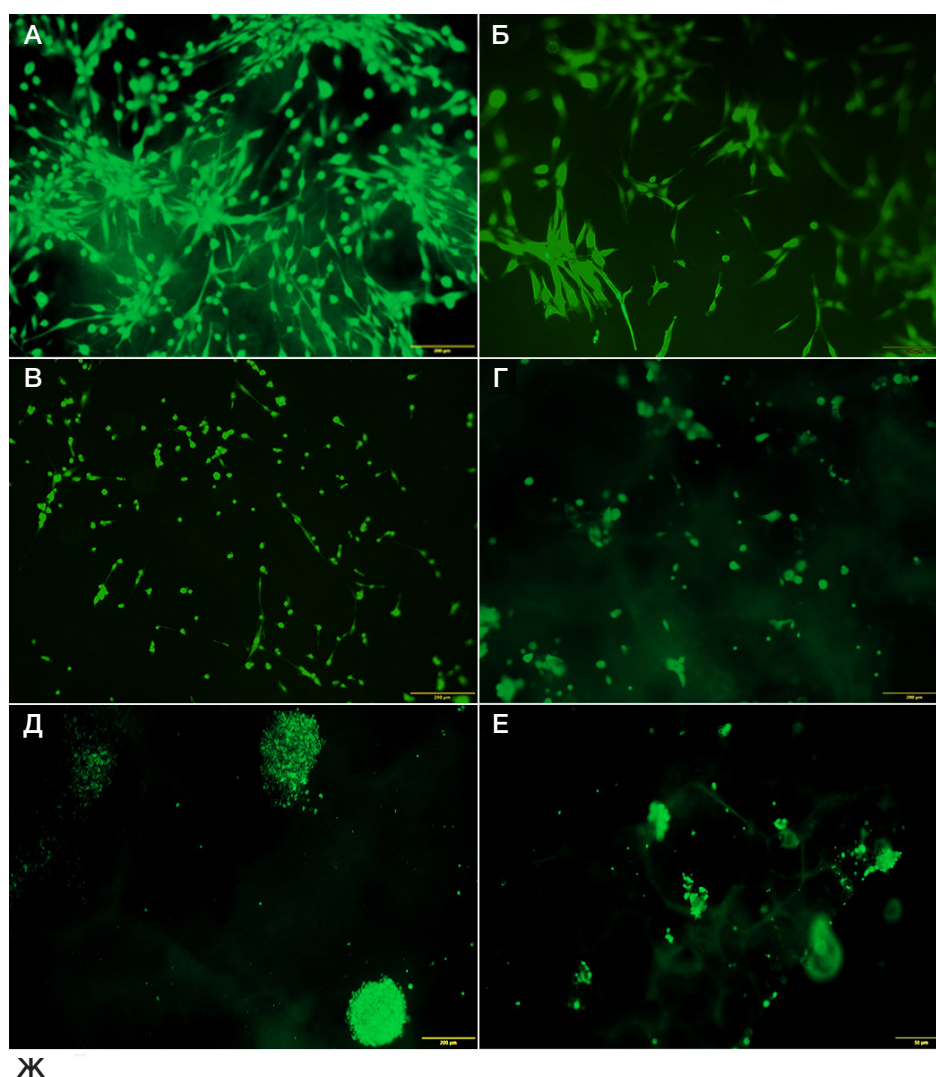


Рис. 1. Выявление живых клеток, окрашенных витальным красителем кальцеином (зеленое окрашивание), на поверхности матрицы в БМКП ДЭК на разных сроках хранения при температуре +22 °С (А–Е): в начале эксперимента (без хранения) нулевые сутки (А), первые сутки (Б), вторые сутки (В), третьи сутки (Г), четвертые сутки (Д) и пятые сутки (Е) хранения. Ж. График, демонстрирующий относительное количество живых клеток в БМКП ДЭК в процентах по отношению к состоянию образцов на нулевые сутки хранения. Данные представлены в виде среднего процента зеленых пикселей в шести полях зрения от трех технических повторов, планки погрешностей \pm SD (%)

что осложняет и увеличивает стоимость их хранения и логистики. Как отмечают наши коллеги из Приволжского исследовательского медицинского университета в обзоре, посвященном криосохранению МСК и БМКП, исследований по криосохранению 3D-структур, содержащих клетки, и БМКП мало, и отсутствует целостное представление о механизмах замораживания подобных продуктов [14]. Для каждого продукта условия разрабатываются отдельно, и способ криосохранения БМКП предназначен в основном для более длительного хранения. В мировой практике биоинженерные тканевые конструкции доставляют к моменту применения «на леду», за исключением случаев

разрешенных FDA коммерчески доступных Dermagraft и Apligraf, которые хранят и транспортируют при -75°C и $+20$ – $+23^{\circ}\text{C}$ соответственно [15]. Таким образом, задача разработки условий краткосрочного хранения тканеинженерных конструкций достаточно актуальна, и, как показал анализ литературы, ее решают индивидуально для каждого варианта продукта.

Целью нашей работы было определение возможности хранения БМКП ДЭК и БЭК при наиболее технически просто выполнимых условиях: без дорогостоящих импортных реагентов, дополнительного оборудования и специальных термических режимов. Кроме того, хранение

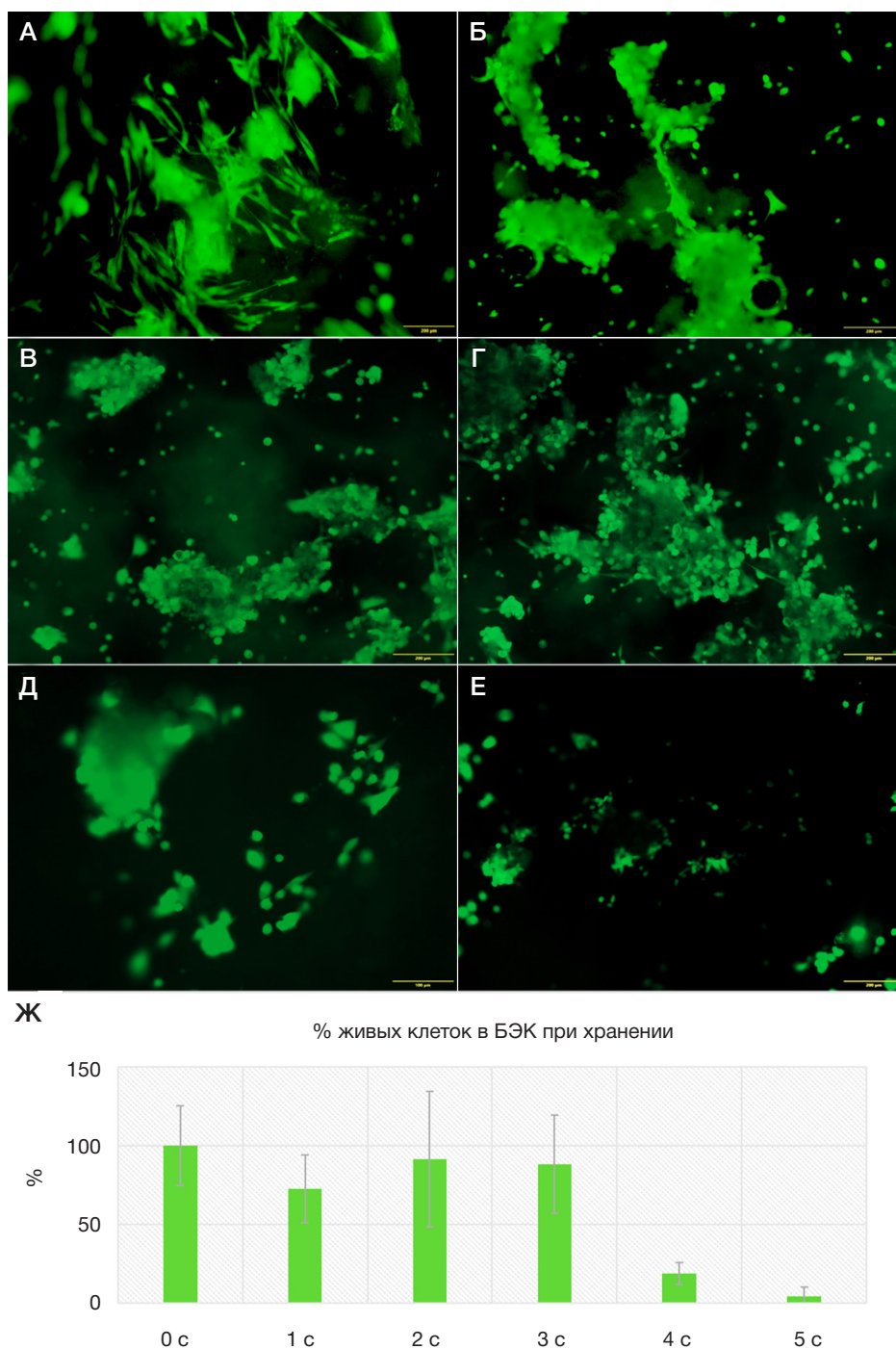


Рис. 2. Выявление живых клеток, окрашенных витальным красителем кальцеином (зеленое окрашивание), на поверхности матрицы в БМКП БЭК на разных сроках хранения при температуре +22 °С (А–Е): в начале эксперимента (без хранения) нулевые сутки (А), первые сутки (Б), вторые сутки (В), третьи сутки (Г), четвертые сутки (Д) и пятые сутки (Е) хранения. Ж. График, демонстрирующий относительное количество живых клеток в БМКП БЭК в процентах по отношению к состоянию образцов на нулевые сутки хранения. Данные представлены в виде среднего процента зеленых пикселей в шести полях зрения от трех технических повторов, планки погрешностей \pm SD (%)

в стерильном физиологическом растворе, который разрешен к использованию в качестве медицинского изделия, упрощает процедуру подготовки БМКП к применению, так как от него не нужно отмывать БМКП перед трансплантацией пациенту.

Нам удалось продемонстрировать, что в целом в течение трех суток хранения при самых простых условиях (комнатная температура и физиологический раствор) ДЭК и БЭК сохраняли свои основные параметры качества. При этом БЭК показал лучшие результаты по сравнению с ДЭК. Более высокий процент выживаемости клеток в БЭК, вероятно, обусловлен наличием в их составе

клеток двух типов, которые положительно влияют на жизнеспособность друг друга. Оценив темпы падения жизнеспособности клеточного компонента в исследуемых образцах, мы пришли к выводу, что хранение более трех суток в текущих условиях приводит к уменьшению живых клеток более чем на 50% в обоих типах БМКП. Соответственно, в дальнейшей работе мы не проводили анализ образцов, хранящихся более 72 ч.

Так как предполагаемый терапевтический эффект БМКП ДЭК и БЭК заключается не только в механическом закрытии кожных ран, но и в стимулирующем регенерацию ранозаживляющем эффекте, важным показателем их

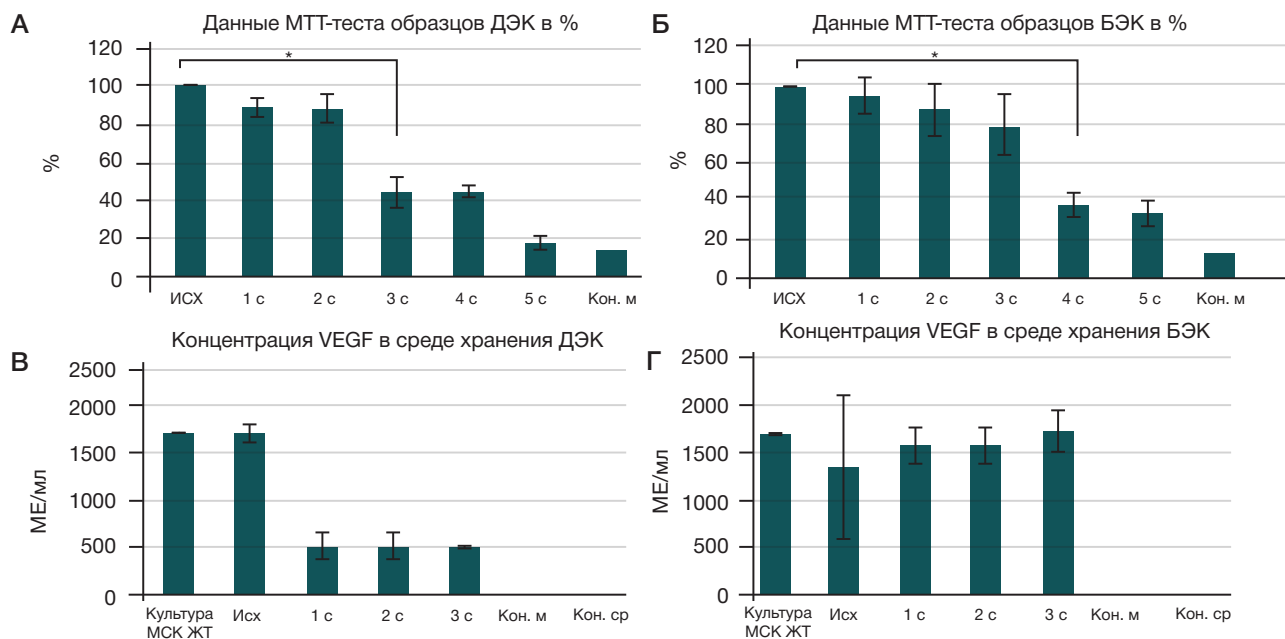


Рис. 3. Результаты изменения при хранении митохондриальной активности клеток в БМКП ДЭК (А) и БЭК (Б), полученные при помощи МТТ-теста и представленные в виде среднего арифметического значения показателей оптической плотности среды на разных сроках хранения по отношению к данным, полученным до начала хранения (нулевые сутки), в процентах в трех технических повторах, планки погрешностей \pm SD (%). Достоверность падения метаболической активности на третьи сутки для ДЭК и четвертые сутки для БЭК показана с использованием теста ANOVA ($p \leq 0,005$). Данные по выявлению наличия VEGF в физиологическом растворе, в котором хранили образцы БМКП ДЭК (В) и БЭК (Г), методом ИФА-анализа представлены в виде среднего арифметического значения показателей оптической плотности среды в девяти повторах, планки погрешностей \pm SD (%). В качестве контролей использовали матрицу без клеток, культуральную среду и исходную культуру МСК ЖТ, которую применяли для приготовления БМКП. Статистически значимых отличий в пробах физраствора в группах хранения в пределах трех суток не выявлено

качества является секреторная активность клеточного компонента. Известно, что клетки мезенхимного ряда, такие как МСК, играют ключевую роль в процессах регуляции клеточных взаимодействий и поддержания гомеостаза тканей [16]. МСК ЖТ способны стимулировать ангиогенез посредством активации роста и стабилизации растущих сосудов [17]. Синтезируемые данными клетками

факторы роста сосудов семейства VEGF способны индуцировать направленную миграцию, пролиферацию, дифференцировку клеток эндотелия в области дефекта, взаимодействуя с их рецепторами VEGF-R, что проявляется уменьшением площади повреждения, а также увеличением количества и объемной плотности кровеносных сосудов [9]. В норме клетки в составе БМКП при культивировании

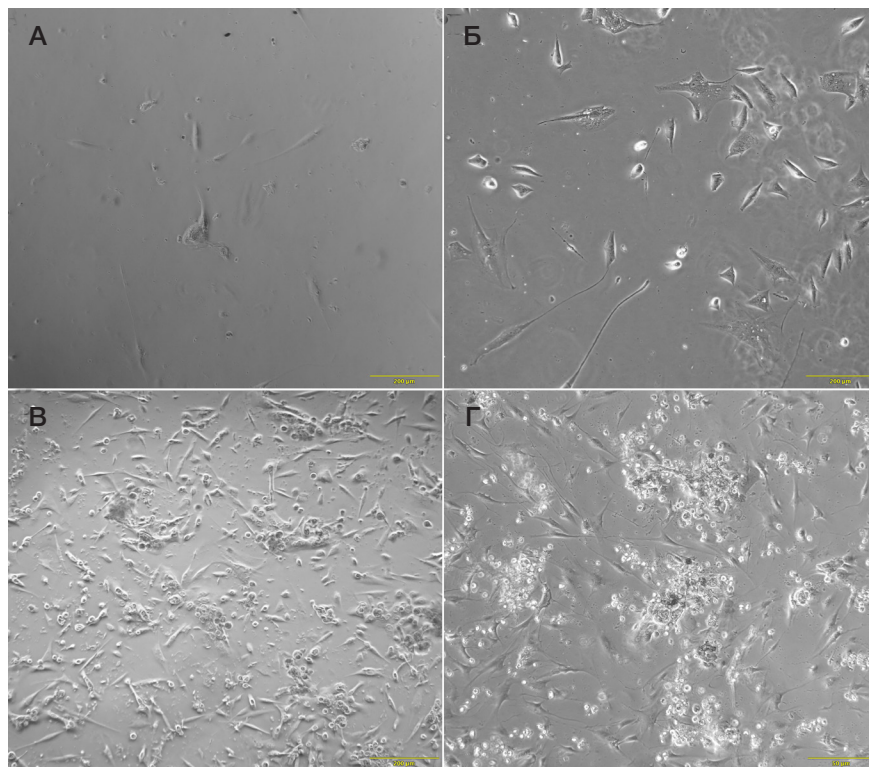


Рис. 4. Культура клеток, выделенных из БМКП ДЭК (А, Б) и БЭК (Б, Г) после 72 ч хранения. Клетки через сутки (А, В) и через трое суток (Б, Г) после выделения (световая микроскопия, фазовый контраст)

активно секретируют факторы роста, в том числе VEGF. В нашем эксперименте в культуральной среде его уровень составлял 1600–2000 МЕ/мл и выше. Кроме того, мы показали, что МСК ЖТ в составе полученных нами БМКП продолжают синтезировать VEGF и в физиологическом растворе, причем уровень его секреции сопоставим с показателями из культуральной среды, в которой БМКП инкубировали до упаковки и закладки на хранение.

Результаты эксперимента с измерением концентрации VEGF для БЭК и ДЭК позволяют нам также предположить, что кератиноциты способствуют выживаемости МСК ЖТ и поддерживают секрецию ими VEGF.

ВЫВОДЫ

При хранении БМКП БЭК в условиях умеренной гипотермии, при комнатной температуре (+22 °C), он сохраняет

жизнеспособность клеточного компонента на уровне, превышающем 50% жизнеспособности относительно начала хранения, в течение трех суток. Жизнеспособность клеточного компонента БМКП ДЭК снижается быстрее, и к третьим суткам мы наблюдали ее значение на уровнях, не превышающих 50% от исходной. Продемонстрированная нами способность МСК ЖТ в составе БМКП секретировать VEGF при хранении в данных условиях может служить показателем паракринной активности этих БМКП, которая может обеспечить терапевтическую роль в лечении кожных ран различной этиологии и быть косвенным признаком функциональной активности клеток в готовом продукте. Показатели жизнеспособности и метаболической активности клеточного компонента БЭК при хранении достоверно выше, чем ДЭК. Полученные результаты важны для ускорения процессов внедрения методов тканевой инженерии и регенеративной медицины в клиническую практику.

Литература

1. Utheim TP, Raeder S, Utheim OA, de la Paz M, Roald B, et al. Sterility control and long-term eye-bank storage of cultured human limbal epithelial cells for transplantation. *Br J Ophthalmol*. 2003; 93: 980–3. DOI: 10.1136/bjo.2008.149591.
2. Mutsenko VV, Rogul'ska OY, Petrenko YA, Ehrlich H, Mazur SP, et al. Cryosensitivity of Mesenchymal Stromal Cells Cryopreserved Within Marine Sponge Ianthella basta Skeleton-Based Carriers. *Probl Cryobiol Cryomedicine*. 2016; 26: 13–23. DOI: 10.15407/cryo26.01.013.
3. Petrenko Y, Petrenko A, Martin I, Wendt D. Perfusion bioreactor-based cryopreservation of 3D human mesenchymal stromal cell tissue grafts. *Cryobiology*. 2017; 76: 150–3. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.001.
4. Arutyunyan I, Elchaninov A, Sukhikh G, Fatkhudinov T. Cryopreservation of Tissue-Engineered Scaffold-Based Constructs: From Concept to Reality. *Stem Cell Rev Rep*. 2022; 18: 1234–52. DOI: 10.1007/s12015-021-10299-4.
5. Knapik A, Kornmann K, Kerl K, Calcagni M, Contaldo C, et al. Practice of split-thickness skin graft storage and histological assessment of tissue quality. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013; 66: 827–34. DOI: 10.1016/j.bjps.2013.02.003.
6. Ge L, Sun L, Chen J, Mao X, Kong Y, et al. The viability change of pigskin in vitro. *Burns*. 2010; 36: 533–8. DOI: 10.1016/j.burns.2009.08.001.
7. Rauen U, Kerkweg U, de Groot H. Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology*. 2007; 54 (1): 77–86. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2006.11.008.
8. Роговая О. С., Петракова О. С., Гвазава И. Г., Борисов М. А., Васильев А. В. Исследование жизнеспособности культивируемых клеток человека в суспензии. *Вестник Московского университета. Серия 16: биология*. 2016. 3: 44–48.
9. Fujita Ya, Nishimura M, Komori NW, Wada T, Shirakawa Ch, et al. A pair of cell preservation solutions for therapy with human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Regen Ther*. 2020; 14: 95–102. DOI: 10.1016/j.reth.2019.10.004.
10. Vackova I, Vavrinova E, Musilkova J, Havlas V, Petrenko Y. Hypothermic Storage of 3D Cultured Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications. *Polymers (Basel)*. 2022; 14 (13): 2553. DOI: 10.3390/polym14132553.
11. Schulze K, López DA, Tillich UM, Frohme M. A simple viability analysis for unicellular cyanobacteria using a new autofluorescence assay, automated microscopy, and Image J. *BMC Biotechnol*. 2011; 11: 118. DOI: 10.1186/1472-6750-11-118.
12. Tam E, McGrath M, Sladkova M, AlManaie A, Alostaad A, de Peppo GM. Hypothermic and cryogenic preservation of tissue-engineered human bone. *Ann NY Acad Sci*. 2020; 1460 (1): 77–87. DOI: 10.1111/nyas.14264.
13. Sampaio-Pinto V, Janssen J, Chirico N, Serra M, Alves PM, et al. Roadmap to Cardiac Tissue-Engineered Construct Preservation: Insights from Cells, Tissues, and Organs. *Adv Mater*. 2021; 33 (27): e2008517. DOI: 10.1002/adma.202008517.
14. Linkova DD, Rubtsova YP, Egorikhina MN. Cryostorage of Mesenchymal Stem Cells and Biomedical Cell-Based Products. *Cells*. 2022; 11 (17): 2691. DOI: 10.3390/cells11172691.
15. Criswell T, Swart C, Stoudenmire J, Brockbank K, Floren M, Eaker S, Hunsberger J. Shipping and Logistics Considerations for Regenerative Medicine Therapies. *Stem Cells Transl Med*. 2022; 11 (2): 107–13. DOI: 10.1093/stcltm/szab025.
16. Jing D, Li C, Yao K, Xie X, Wang P, et al. The vital role of Gli1+ mesenchymal stem cells in tissue development and homeostasis. *J Cell Physiol*. 2021; 236 (9): 6077–89. DOI: 10.1002/jcp.30310.
17. Krawczenko A, Klimczak A. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Contribution to Angiogenic Processes in Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (5): 2425. DOI: 10.3390/ijms23052425.

References

1. Utheim TP, Raeder S, Utheim OA, de la Paz M, Roald B, et al. Sterility control and long-term eye-bank storage of cultured human limbal epithelial cells for transplantation. *Br J Ophthalmol*. 2003; 93: 980–3. DOI: 10.1136/bjo.2008.149591.
2. Mutsenko VV, Rogul'ska OY, Petrenko YA, Ehrlich H, Mazur SP, et al. Cryosensitivity of Mesenchymal Stromal Cells Cryopreserved Within Marine Sponge Ianthella basta Skeleton-Based Carriers. *Probl Cryobiol Cryomedicine*. 2016; 26: 13–23. DOI: 10.15407/cryo26.01.013.
3. Petrenko Y, Petrenko A, Martin I, Wendt D. Perfusion bioreactor-based cryopreservation of 3D human mesenchymal stromal cell tissue grafts. *Cryobiology*. 2017; 76: 150–3. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.001.
4. Arutyunyan I, Elchaninov A, Sukhikh G, Fatkhudinov T. Cryopreservation of Tissue-Engineered Scaffold-Based Constructs: From Concept to Reality. *Stem Cell Rev Rep*. 2022; 18: 1234–52. DOI: 10.1007/s12015-021-10299-4.
5. Knapik A, Kornmann K, Kerl K, Calcagni M, Contaldo C, et al.

- Practice of split-thickness skin graft storage and histological assessment of tissue quality. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013; 66: 827–34. DOI: 10.1016/j.bjps.2013.02.003.
6. Ge L, Sun L, Chen J, Mao X, Kong Y, et al. The viability change of pigskin in vitro. *Burns*. 2010; 36: 533–8. DOI: 10.1016/j.burns.2009.08.001.
 7. Rauen U, Kerkweg U, de Groot H. Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology*. 2007; 54 (1): 77–86. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2006.11.008.
 8. Rogovaya OS, Petrakova OS, Gvazava IG, Borisov MA, Vasilev AV. Issledovanie zhiznesposobnosti kul'tiviruemykh kletok cheloveka v suspenzii. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16: biologiya*. 2016. 3: 44–48.
 9. Fujita Ya, Nishimura M, Komori NW, Wada T, Shirakawa Ch, et al. A pair of cell preservation solutions for therapy with human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Regen Ther*. 2020; 14: 95–102. DOI: 10.1016/j.reth.2019.10.004.
 10. Vackova I, Vavrinova E, Musilkova J, Havlas V, Petrenko Y. Hypothermic Storage of 3D Cultured Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications. *Polymers (Basel)*. 2022; 14 (13): 2553. DOI: 10.3390/polym14132553.
 11. Schulze K, López DA, Tillich UM, Frohme M. A simple viability analysis for unicellular cyanobacteria using a new autofluorescence assay, automated microscopy, and Image J. *BMC Biotechnol*. 2011; 11: 118. DOI: 10.1186/1472-6750-11-118.
 12. Tam E, McGrath M, Sladkova M, AlManaie A, Alostaad A, de Peppo GM. Hypothermic and cryogenic preservation of tissue-engineered human bone. *Ann NY Acad Sci*. 2020; 1460 (1): 77–87. DOI: 10.1111/nyas.14264.
 13. Sampaio-Pinto V, Janssen J, Chirico N, Serra M, Alves PM, et al. Roadmap to Cardiac Tissue-Engineered Construct Preservation: Insights from Cells, Tissues, and Organs. *Adv Mater*. 2021; 33 (27): e2008517. DOI: 10.1002/adma.202008517.
 14. Linkova DD, Rubtsova YP, Egorikhina MN. Cryostorage of Mesenchymal Stem Cells and Biomedical Cell-Based Products. *Cells*. 2022; 11 (17): 2691. DOI: 10.3390/cells11172691.
 15. Criswell T, Swart C, Stoudemire J, Brockbank K, Floren M, Eaker S, Hunsberger J. Shipping and Logistics Considerations for Regenerative Medicine Therapies. *Stem Cells Transl Med*. 2022; 11 (2): 107–13. DOI: 10.1093/stcltm/szab025.
 16. Jing D, Li C, Yao K, Xie X, Wang P, et al. The vital role of Gli1+ mesenchymal stem cells in tissue development and homeostasis. *J Cell Physiol*. 2021; 236 (9): 6077–89. DOI: 10.1002/jcp.30310.
 17. Krawczenko A, Klimczak A. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Contribution to Angiogenic Processes in Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (5): 2425. DOI: 10.3390/ijms23052425.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МИКРОДИССЕКЦИИ БЛЕСТЯЩЕЙ ОБОЛОЧКИ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ЕЕ ТОЛЩИНУ

Д. С. Ситников¹ ✉, И. В. Ильина¹, М. А. Филатов², Ю. Ю. Силаева²

¹ Объединенный институт высоких температур Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

Блестящая оболочка (*zona pellucida*, ZP) — динамически меняющийся объект, играющий важную роль на преимплантационной стадии развития эмбриона. Ее толщина может оказывать влияние на успешность имплантации и частоту наступления беременности, в ряде исследований ее рассматривают как прогностический критерий. Целью работы было исследовать динамику толщины блестящей оболочки эмбриона мыши в результате процедуры вспомогательного лазерного хетчинга (ВЛХ), когда нарушение целостности ZP проводят на стадии бластоцисты. Для микрохирургии оболочки использовали импульсы излучения фемтосекундной длительности. Измерение толщины оболочки проводили как на стадии микрохирургии бластоцисты (~E3.5, т. е. 3,5 дня эмбрионального развития), так и на стадии вылупления (~E5). Обнаружены статистически значимые различия толщины ZP эмбрионов в контрольной группе — с 6,21 мкм (E3.5) до 5,4 мкм (E5). В группе, подвергавшейся ВЛХ, изменения толщины с 6,6 мкм (E3.5) до 6,2 мкм (E5) оказались статистически незначимыми. Отслеживание толщины ZP индивидуального эмбриона от стадии бластоцисты до стадии вылупления позволило оценить коэффициент истончения для контрольной и экспериментальной групп. Полученные данные свидетельствуют о снижении предела прочности оболочки при проведении ВЛХ и могут служить базисом для последующих исследований ее свойств в случае применения протоколов криоконсервации эмбрионов.

Ключевые слова: бластоциста, толщина блестящей оболочки, истончение, вспомогательный лазерный хетчинг, фемтосекундные лазерные импульсы

Финансирование: экспериментальные исследования по ВЛХ были выполнены с использованием УНУ «Лазерный тераваттный фемтосекундный комплекс», входящим в состав ЦКП «Лазерный фемтосекундный комплекс» ОИВТ РАН при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Государственного задания № 075-01129-23-00. Эмбрионы были получены с использованием Уникальной научной установки «Трансгенбанк» при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках проекта (Соглашение № 075-15-2021-668 от 29.07.2021).

Вклад авторов: Д. С. Ситников — проведение лазерной микрохирургии, обработка результатов, написание статьи; И. В. Ильина — идея исследования, написание статьи; М. А. Филатов — работа с эмбрионами, статистическая обработка, написание статьи; Ю. Ю. Силаева — руководство; обсуждение и редактирование статьи — все авторы.

Соблюдение этических стандартов: все манипуляции с животными производили в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и рекомендациями комиссии по биоэтике Института биологии гена РАН.

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Сергеевич Ситников
ул. Красноказарменная, д. 17а, г. Москва, 111116, Россия; sitnik.ds@gmail.com

Статья получена: 09.11.2022 **Статья принята к печати:** 30.12.2022 **Опубликована онлайн:** 27.01.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.002

ASSESSMENT OF THE ZONA PELLUCIDA MICRODISSECTION ON ITS THICKNESS IN MAMMALIAN EMBRYOS

Sitnikov DS¹ ✉, Ilina IV¹, Filatov MA², Silaeva YuYu²

¹ Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The zona pellucida (ZP) is a dynamically changing object that plays an important role during the preimplantation stage of embryogenesis. The ZP thickness may affect the implantation success and pregnancy rate, it is considered as a prognostic factor in a number of studies. The study was aimed to assess the dynamic changes in the mouse embryonic ZP thickness after laser assisted hatching (LAH) that involved breaching the ZP integrity at the blastocyst stage. Femtosecond laser pulses were used to perform the zona microsurgery. The zona thickness was measured both at the stage of blastocyst microsurgery (~E3.5, i.e. 3.5 days of embryogenesis) and at the hatching stage (~E5). Significant differences in the ZP thickness were revealed in the control group of embryos: from 6.21 μ m (E3.5) to 5.4 μ m (E5). The changes in thickness from 6.6 μ m (E3.5) to 6.2 μ m (E5) observed in the group subjected to LAH were non-significant. Tracing the ZP thickness of a particular embryo from the blastocyst stage to the hatching stage made it possible to estimate the thinning coefficients in the experimental and control groups. The findings that indicate lower tensile strength of the zona in case of LAH can provide the basis for further research on the ZP properties in case of using the embryo cryopreservation protocols.

Keywords: blastocyst, zona pellucida thickness, thinning, laser assisted hatching, femtosecond laser pulses

Funding: experimental studies of laser assisted hatching were performed using the unique scientific facility "Terawatt Femtosecond Laser Complex" in the Center for Collective Usage "Femtosecond Laser Complex" of JIHT RAS and were funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State Assignment № 075-01129-23-00). Embryos were obtained using the unique scientific facility Transgenebank and supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (grant № 075-15-2021-668 of 29.07.2021).

Author contribution: Sitnikov DS — laser microsurgery, data processing, manuscript writing; Ilina IV — study concept, manuscript writing; Filatov MA — handling embryos, statistical processing, manuscript writing; Silaeva YuYu — management; discussion and manuscript editing — all authors.

Compliance with ethical standards: animals were handled in accordance with the Declaration of Helsinki and the guidelines issued by the Bioethics Commission at the Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry S. Sitnikov
Krasnokazarmennaya, 17a, Moscow, 111116, Russia; sitnik.ds@gmail.com

Received: 09.11.2022 **Accepted:** 30.12.2022 **Published online:** 27.01.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.002

Блестящая оболочка (*zona pellucida*, ZP) представляет собой внеклеточный матрикс, окружающий ооцит на ранних стадиях развития и выполняющий ряд важных функций на стадии оогенеза, оплодотворения и преимплантационного развития. Блестящая оболочка выполняет функцию физического барьера для защиты эмбриона от микроорганизмов, вирусов и иммунных клеток, которые могут присутствовать в яйцевом [1]. Она позволяет ооциту после овуляции свободно перемещаться в фаллопиевой трубе, предотвращает имплантацию эмбриона в стенку яйцевода [2], обеспечивает возможность видоспецифичного оплодотворения, индукцию акросомной реакции у сперматозоидов и блокирование полиспермного оплодотворения [3]. Ограничение объема эмбриона внутри ZP на стадии дробления обеспечивает более тесный контакт между бластомерами, необходимый для компактизации [4], а в дальнейшем поддерживает целостность внутренней клеточной массы (ВКМ) [5]. Толщина блестящей оболочки эмбриона имеет большое значение и оказывает влияние на его дальнейшую судьбу — от оплодотворения до его имплантации в эндометрий.

Существует ряд факторов, под влиянием которых эмбрион может испытывать затруднение с самостоятельным вылуплением из оболочки и последующей имплантацией, например, при наличии более толстой (более 17 мкм) [6, 7] или плотной блестящей оболочки, либо в случае, если нарушена выработка ферментов, отвечающих за лизис *zona pellucida* [8]. В последнее десятилетие широкое распространение в клиниках приобрела процедура вспомогательного лазерного хетчинга (ВЛХ), основанная на воздействии на ZP лазерными импульсами для истончения или сквозного иссечения оболочки с целью упрощения последующего вылупления эмбриона. Как правило, для этого применяют инфракрасные лазерные диссекторы миллисекундной длительности. В результате поглощения лазерного импульса оболочкой происходит локальное разрушение белков ZP вследствие нагрева до нескольких сотен градусов [9]. Размер области диссекции обусловлен энергией лазерного импульса, теплофизическими свойствами объекта и составляет 5–20 мкм. Ввиду возможного риска термического повреждения клеток эмбриона, прилегающих к оболочке, лазерную микродиссекцию рекомендуют делать с соблюдением жестких регламентов, в основном, на ранних стадиях преимплантационного развития эмбриона, для которых характерно более широкое перивителлиновое пространство (т. е. расстояние между прозрачной оболочкой и клеточной мембраной яйцеклетки или зиготы) по сравнению с поздними стадиями преимплантационного развития.

Альтернативой применяемым коммерческим решениям может служить технология лазерной микрохирургии с использованием лазерных импульсов фемтосекундной длительности. В основе физики взаимодействия фемтосекундного импульса с биологическим объектом лежат процессы многофотонного поглощения, а процесс локального нарушения целостности ZP носит нетепловой характер [10]. Данное обстоятельство позволяет предельно локализовать область лазерного воздействия, ограничиваясь размером пятна фокусировки излучения в пределах ~1,5–2 мкм. Преимущества использования фемтосекундных лазерных импульсов, включая минимальную ширину диссекции ZP и минимизацию теплового воздействия излучения на прилегающие клетки эмбриона, были реализованы ранее в технологиях

управляемого вспомогательного хетчинга [11] и маркировки эмбрионов на преимплантационной стадии развития [12, 13].

Интерес к исследованиям свойств ZP повышается желанием обнаружить надежные индикаторы качества ооцита. Именно качество ооцитов рассматривают как один из ключевых факторов фертильности женщины, поскольку оно определяет исходный потенциал для развития эмбриона [14]. Так, в ряде работ были исследованы корреляции толщины ZP (как одного из индикаторов) [15, 16], а также вариативность ее значения у эмбриона с частотой наступления беременности и имплантации [6, 15, 17, 18]. Механические свойства оболочки рассматривали также в качестве предикторов успешности развития ооцитов после оплодотворения [19], качества эмбрионов [20] и успешности имплантации [21].

Несмотря на то что ВЛХ применяют в клинической практике несколько десятилетий, детальных исследований, посвященных тому, как данная процедура влияет на структуру, морфологию прозрачной оболочки, чрезвычайно мало. Актуальность проведения подобных исследований не вызывает сомнений, так как анализ динамических изменений прозрачной оболочки при искусственном нарушении ее целостности по сравнению с естественным циклом позволит получить дополнительную информацию о механизмах разрушения/истончения оболочки и факторах, определяющих успешность вылупления и последующей имплантации эмбрионов. Кроме того, на сегодняшний день в клиническую практику внедрены эффективные подходы криоконсервации эмбрионов на любой стадии их преимплантационного развития с использованием метода витрификации. В то же время имеются данные об изменении физико-химических свойств ZP таких эмбрионов и возможном ее уплотнении или утолщении (так называемое уплотнение блестящей оболочки (*zona hardening*)) [22]. С учетом этого, важно изучение влияния ВЛХ на изменение свойств оболочки, так как полученные данные могут служить основой при сравнительном анализе особенностей вылупления эмбрионов, подвергавшихся витрификации.

Целью работы является исследование влияния ВЛХ с помощью фемтосекундного лазера на характеристики блестящей оболочки эмбрионов домового мыши на стадии бластоцисты. Данный этап развития эмбриона является начальным в процессе хетчинга эмбриона, на котором блестящая оболочка подвергается существенным деформирующим нагрузкам. Принципиальную возможность микрохирургии оболочки на стадии бластоцисты (т. е. на более поздней стадии преимплантационного развития) обеспечивает применение лазерных импульсов фемтосекундной длительности. Как было показано нами ранее [11, 23], микрохирургия ZP с их использованием не оказывает негативного влияния на дальнейшее развитие эмбриона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная установка

Эксперименты по микрохирургии эмбрионов выполняли на установке «Фемтосекундный лазерный скальпель» (рис. 1), созданной в ОИВТ РАН [24]. В качестве лазерного скальпеля использовали излучение фемтосекундного лазерного источника ТЕТА («Авеста»; Троицк). Лазерные импульсы после преобразования во вторую гармонику излучения в кристалле ДКДП имели следующие параметры: длительность импульса — 280 фс, энергия — 50 мкДж,

длина волны излучения — 514 нм, частота следования импульсов — 2,5 кГц. Лазерное излучение заводилось в правый боковой порт инвертированного микроскопа Olympus IX-71 и фокусировалось микрообъективом 20xUPlanFL (Olympus; Япония) с числовой апертурой NA = 0,5 в пятно диаметром ~2 мкм по полувысоте. Узел ослабления, установленный на пути лазерного излучения до заведения в микроскоп, служил для регулировки энергии лазерных импульсов, а узел телескопа — для согласования диаметра лазерного пучка с апертурой микрообъектива. При выполнении микрохирургических процедур энергия лазерных импульсов составляла 20 нДж, что соответствовало интенсивности 2,5 ТВт/см². Эмбрионы рассаживали в каплю среды для культивирования в чашки Петри со стеклянным дном толщиной 170 мкм. Чашку Петри устанавливали на моторизованном предметном столике микроскопа (Märzhäuser Wetzlar; Германия) для перемещения эмбриона относительно неподвижного лазерного луча. Излучение фокусировали в плоскости максимального сечения эмбриона — в «экваториальной» плоскости. Изображение эмбриона регистрировали камерой DFK 72AUC02 (The Imaging Source; Германия). Для автоматизации процедуры микрохирургии использовали программное обеспечение, позволяющее оператору задавать траекторию движения лазерного луча поверх изображения эмбриона.

Животные

Для получения эмбрионов использовали гибридных мышей F1 C57Bl/6JxСВА из питомника Федерального медико-биологического агентства России (филиал «Столбовая»; Россия). Животных содержали в контролируемых условиях (22–24 °С при световом режиме 14 ч день : 10 ч ночь) с доступом к питанию (специализированный экструдированный комбикорм для разведения мышей) и воде *ad libitum*.

Гормональная стимуляция овуляции

Для получения большого числа эмбрионов одновременно применяли широко используемый протокол стимуляции овуляции. В качестве доноров использовали неполовозрелых самок весом 10–12 г в возрасте около трех недель. Гормональную стимуляцию осуществляли в соответствии с двухступенчатым протоколом: в 13:00 первого дня внутрибрюшинно вводили ГСЖК (препарат Фоллимаг, «Мосагроген», Россия) из расчета 5 МЕ на одно животное, через 48 ч внутрибрюшинно вводили ХГЧ (препарат Хорулон; Merck Animal Health, США) из расчета 10 МЕ на одно животное, после чего ссаживали данных самок с самцами для спаривания.

Получение эмбрионов

Умерщвление животных осуществляли путем дислокации шейных позвонков. Получение эмбрионов на стадии зиготы производили в день обнаружения вагинальной пробки. Из животного с помощью ножниц вырезали яйцеводы и помещали их в предварительно нагретую до 37 °С HEPES-содержащую среду Ооклин («Пан-Эко»; Россия). Затем под контролем стереомикроскопа с помощью игл от шприцов вскрывали ампулярные части яйцеводов и извлекали из них ооцит-кумулюсные комплексы. Затем в данную каплю вносили примерно 0,03 г гиалуронидазы (препарат Лидаза; «Микроген», Россия) для очистки зигот от клеток

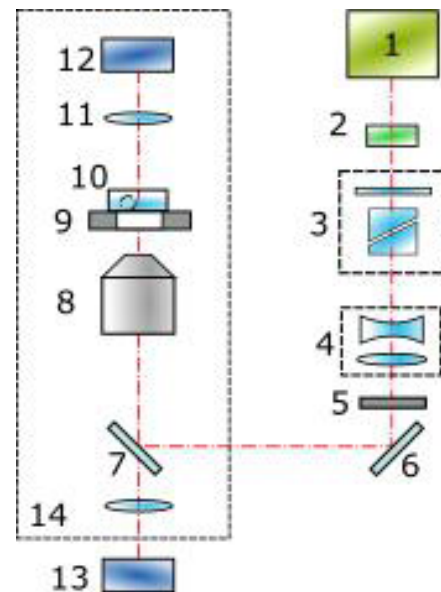


Рис. 1. Схема фемтосекундного лазерного скальпеля. 1 — фемтосекундный лазер; 2 — преобразователь излучения во вторую гармонику; 3 — узел ослабления; 4 — узел телескопа; 5 — механический прерыватель лазерного излучения; 6, 7 — зеркала на длину волны лазерного излучения; 8 — микрообъектив; 9 — моторизованный предметный столик; 10 — чашка Петри с эмбрионами; 11 — конденсор микроскопа; 12 — осветитель; 13 — КМОП-камера; 14 — инвертированный микроскоп

кумулюса. Полученные зиготы последовательно отмывали в четырех каплях среды Ооклин, после чего переносили в среду для культивирования.

Перевозка эмбрионов

Для транспортировки из ИБГ РАН в ОИВТ РАН для проведения процедуры ВЛХ эмбрионы помещали в предварительно нагретую до 37 °С HEPES-содержащую среду Ооклин («Пан-Эко»; Россия). Перевозку осуществляли в пробирках эппендорф объемом 2 мл. Пробирку с эмбрионами перевозили при стабильном тепловом режиме +37 °С. После перевозки эмбрионы отмывали в среде для культивирования, трижды перенося их по каплям.

Культивирование эмбрионов

Культивирование эмбрионов до стадии морулы (примерно 2,5 дня эмбрионального развития, E2,5) осуществляли в четырехлуночных планшетах (Thermo Fisher Scientific Nunc; США), используя среду для культивирования гамет и эмбрионов CSCM-C (Fujifilm Irvine Scientific; США). От стадии морулы до стадии бластоцисты (E3,5) эмбрионы культивировали в покрытых минеральным маслом (Origio; Дания) каплях среды CSCM-C (Fujifilm Irvine Scientific; США) объемом 20 мкл по 2–3 эмбриона в капле.

Эксперимент

В каждой чашке Петри со стеклянным дном (кат. № 200350; SPL Lifesciences, Корея) предварительно формировали по три капли со средой для культивирования, которые затем покрывали минеральным маслом. За день до эксперимента эмбрионы на стадии морулы рассаживали в подготовленные чашки Петри и переносили в инкубатор. В каждую каплю помещали по три эмбриона. Микрохирургию прозрачной оболочки эмбрионов осуществляли на стадии бластоцисты (~E3,5).

Эмбрионы в количестве 99 штук были разделены на две группы: экспериментальную (Э) — 63 штуки и группу параллельного контроля (ПК) — 36 штук. Оператор делал фотографию эмбриона в исходном состоянии, задавал траекторию движения лазерного луча для микродиссекции оболочки эмбриона, выполнял процедуру ВЛХ и делал финальный снимок эмбриона после процедуры. Общее время, затрачиваемое на один эмбрион, не превышало 1,5 мин. Вылупление эмбрионов происходило, как правило, на стадии E5, когда осуществлялась очередная фотосъемка эмбрионов.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (Dell; США), Microsoft Excel 2013 (Microsoft corporation; США). С использованием критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка были проверены гипотезы о нормальности распределений исследуемых показателей. Поскольку представленные в работе данные имели распределения, отличные от нормального, то для их анализа использовали непараметрические критерии. В данном случае значимыми показателями служили медиана, квартили (25–75%) и вариация (минимальное и максимальное значения) исследуемой величины. Для сравнения двух независимых групп использовали критерий Манна–Уитни (U-критерий); для сравнения двух зависимых групп использовали критерий Уилкоксона для связанных выборок. Критический уровень значимости для всех статистических критериев принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2А показан фрагмент оболочки эмбриона до воздействия лазерным излучением. Прimitives (зеленые линии 1–3) задавали траекторию движения лазерного луча. Лазерное воздействие вдоль ломанной линии 1 было необходимо для нарушения целостности оболочки эмбриона в рамках процедуры ВЛХ. Прорезание ZP осуществляли примерно на 80–90% ее толщины. Линии 2 и 3 были вспомогательными (для подтверждения, что эмбрион вылуплился именно через искусственно сформированное отверстие (рис. 2Б)). Для каждого эмбриона экспериментальной группы проводили измерение толщины ZP на момент выполнения операции. Толщину оболочки Δ измеряли в трех разных областях с угловым шагом ~90–120°. Аналогичные измерения толщины ZP эмбриона были выполнены на стадии вылупления эмбриона или после ее окончания как в экспериментальной группе (рис. 2В), так и в группе ПК (рис. 2Г).

Данные о толщине прозрачной оболочки эмбрионов экспериментальной и контрольной групп представлены на рис. 3. Как известно, в процессе вылупления в естественном цикле ZP подвергается растяжению. Так, нами было показано, что толщина блестящей оболочки демонстрирует статистически значимое уменьшение Δ_{cp} с 6,21 мкм (E3,5) до 5,4 мкм (E5) для контрольной группы эмбрионов, не подвергнутых лазерному воздействию. Для экспериментальной группы подобного истончения прозрачной оболочки не обнаружено, и измеренные значения Δ_{cp} составили 6,6 мкм (E3,5) и 6,2 мкм (E5). Проведенная статистическая обработка экспериментальных данных (с использованием U-критерия Манна–Уитни) подтвердила статистически значимое

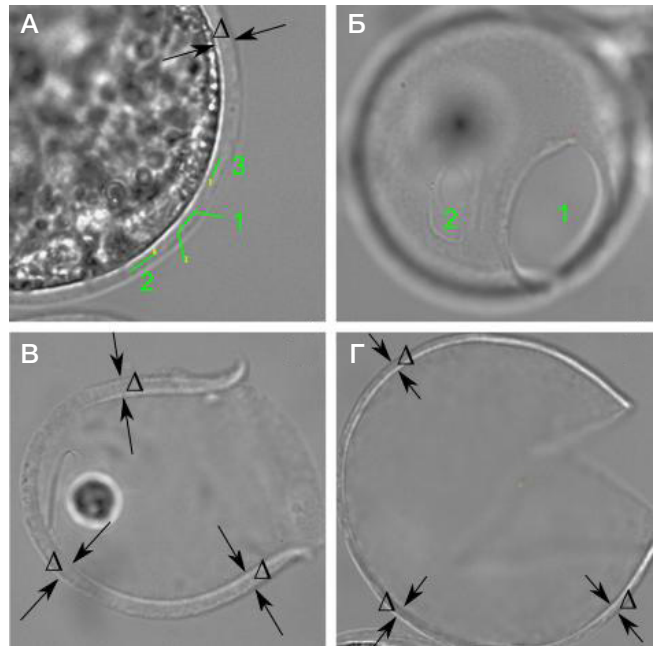


Рис. 2. Фотографии эмбриона до проведения микрохирургии оболочки (А); прозрачной оболочки после вылупления (Б). 1 — отверстие в ZP после хетчинга бластоцисты в результате формирования разреза по траектории 1 (на фрагменте а); 2 — результат реза по траектории 2 (на фрагменте а). Оболочка после вылупления эмбриона в экспериментальной группе (В) и группе ПК (Г)

различие значений толщины ZP (E5) в цикле естественного вылупления и после процедуры ВЛХ.

Еще одним интересным параметром является коэффициент истончения оболочки $K = \Delta_{E5} / \Delta_{E3,5}$, где $\Delta_{E3,5}$ и Δ_{E5} — толщина оболочки отдельно взятого эмбриона спустя 3,5 и 5 дней после оплодотворения соответственно. Его медианное значение для экспериментальной группы составляет $K_{мед.э} = 0,95$. Столбцы диаграммы (рис. 4А) правее линии $K = 1$ означают, что толщина ZP на стадии вылупления превышала таковую на момент проведения операции микрохирургии. В отдельных случаях зафиксированная разница достигала 23%. Это может быть связано с тем, что в процессе вылупления бластоциста демонстрирует периодические изменения своего объема (экспандирование и коллапсирование), растягивая при этом блестящую оболочку [25]. При этом измерение толщины ZP на стадии микрохирургии (E3,5) пришлось на фазу растяжения. В случае контрольной группы оценку толщины оболочки также осуществляли у эмбрионов, достигших стадии бластоцисты (E3,5). Как следует из рис. 4Б, ZP подавляющего большинства эмбрионов истончается в процессе вылупления. Доля эмбрионов, для которых $K > 1$, составляет менее 20% и по аналогии с экспериментальной группой может быть связана с измерением толщины блестящей оболочки бластоцисты (E3,5) в момент экспандирования. Медианные значения коэффициента $K_{мед.пк} = 0,84$ также свидетельствуют о большем истончении ZP у эмбрионов, вылупившихся в естественном цикле.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вылупление эмбриона из блестящей оболочки является важнейшим этапом, необходимым для его дальнейшей имплантации в полость матки. Процессу вылупления (хетчинга) предшествуют периодические фазы экспандирования и коллапсирования бластоцисты.

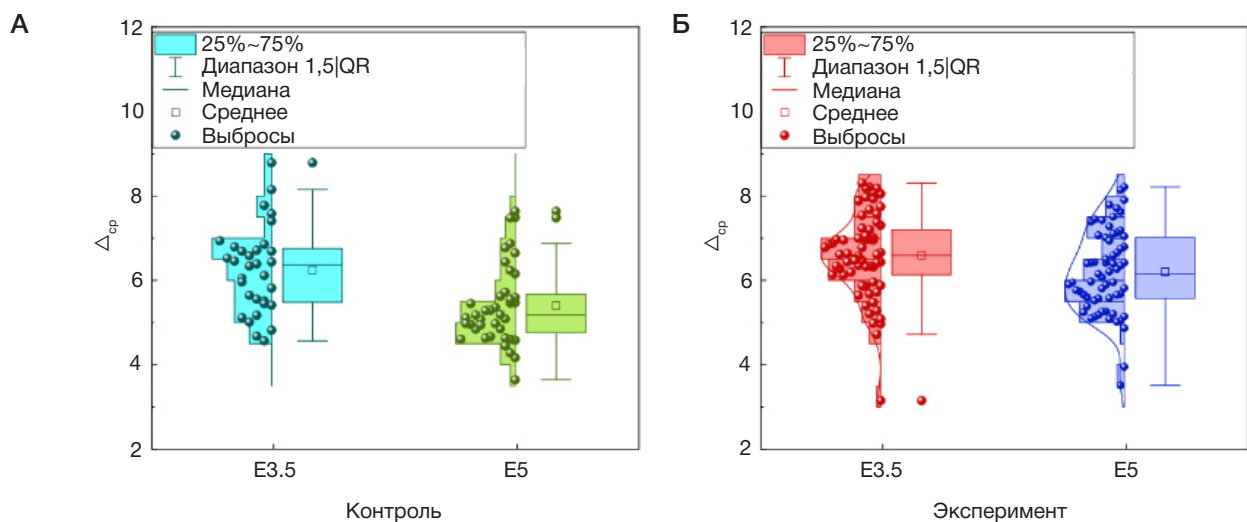


Рис. 3. Изменение толщины ZP в процессе развития эмбриона в контрольной группе (А), в экспериментальной группе (Б)

Изменение ее объема приводит к механическому воздействию на ZP, что вызывает ее растяжение и истончение. Под воздействием растягивающих напряжений и протеаз (например, трипсина), синтезируемых маткой и/или бластоцистой, происходит нарушение целостности ZP, что делает хетчинг бластоцисты возможным.

С точки зрения механики, наблюдаемые различия в экспериментальной и контрольной группах могут быть интерпретированы следующим образом. Предел прочности — это пороговая величина прикладываемого к образцу механического напряжения, превышение которой приводит к разрушению материала. Применительно к процессу вылупления, ZP эмбриона в фазе экспандирования бластоцисты испытывает постоянные растягивающие напряжения. Превышение ими порогового значения приводит к разрыву ZP и инициации процесса хетчинга. Существует большое количество исследований, целью которых является создание моделей, описывающих механические свойства оболочки. Применяемые подходы включают в себя описание ZP как среды, обладающей линейно-упругими, гиперупругими или вязко-гиперупругими свойствами (подробное изложение современного состояния в области аналитических и численных подходов можно найти в опубликованной недавно работе [26]).

Построение моделей механических свойств блестящей оболочки эмбриона мыши выходит за рамки настоящей

работы. Вместе с тем, полученные данные могут быть проанализированы с учетом имеющихся представлений о свойствах ZP. Анализ гистограмм на рис. 4 демонстрирует качественное согласие с имеющимися моделями. При увеличении диаметра бластоцисты происходит рост растягивающих напряжений в блестящей оболочке, ее радиус увеличивается, а толщина уменьшается. На сегодняшний день имеются литературные данные значений модуля Юнга (коэффициент пропорциональности между прикладываемым напряжением и деформацией среды) ZP млекопитающих; для ооцита и эмбриона мыши эти значения составляют 17,9 и 42,2 кПа соответственно [27]. Модуль Юнга характеризует свойства среды на линейном участке диаграммы деформация-напряжение вплоть до предела текучести, когда нагруженный эластично образец при растяжении удлиняется, но возвращается к своей изначальной форме и размеру при разгрузке. При превышении этого предела среда перестает демонстрировать упругие свойства и испытывает пластические деформации (не полностью возвращается к своему первоначальному состоянию). Значения коэффициента истончения $K < 1$ на рис. 4б свидетельствуют о наличии пластических деформаций, сохраняющихся после прекращения действия растягивающих напряжений. По достижении пороговых значений напряжений (предела прочности) происходит разрыв оболочки и вылупление

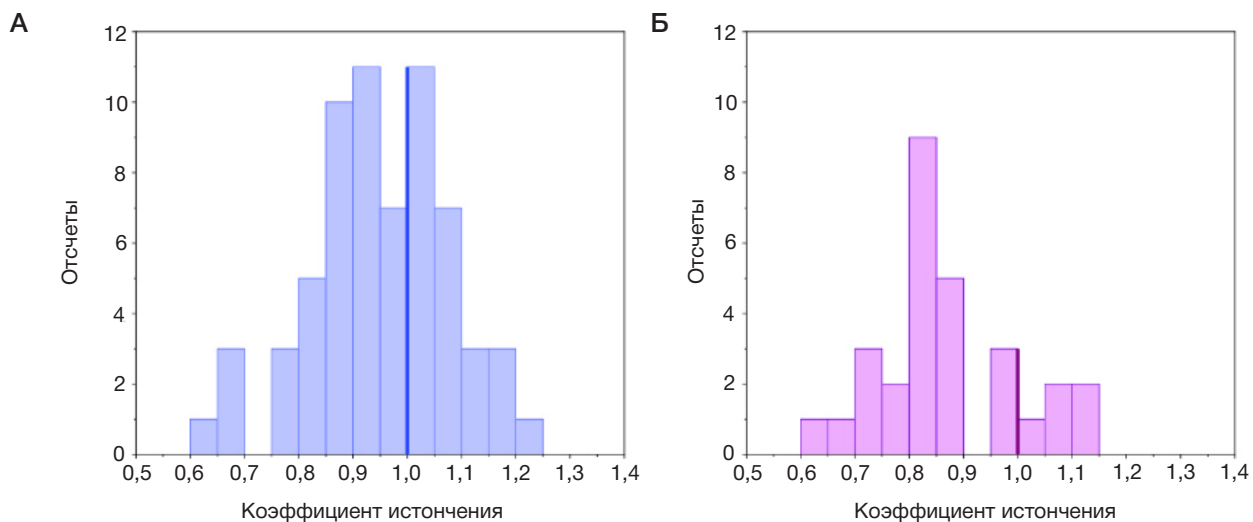


Рис. 4. Распределение коэффициента истончения ZP в экспериментальной (А) и контрольной (Б) группах

эмбриона. Нарушение целостности ZP в процедуре ВЛХ приводит к существенному снижению этого порога, о чем свидетельствуют средние значения толщины блестящей оболочки $\Delta_{\text{Е5}}$ и коэффициента истончения K , превышающие таковые в контрольной группе. В работе [25] высказывается предположение о причине снижения способности к имплантации: оно может быть обусловлено негативным влиянием толстой оболочки на экспансию бластоцисты. Данная гипотеза согласуется с теорией сопротивления материалов и необходимостью приложения большей силы на единицу поверхности для деформации более толстого слоя оболочки.

Воздействие процедур по криоконсервации на состояние блестящей оболочки ооцитов/эмбрионов изучено достаточно подробно, имеется множество свидетельств, указывающих на то, что в результате криоконсервации их блестящая оболочка становится более жесткой [22, 28]. Однако вопрос, касающийся того, как криоконсервация влияет на состояние и свойства блестящей оболочки на более поздних стадиях эмбрионального развития, требует дальнейшего изучения. Следующим логичным шагом в проведении эксперимента представляется замена объекта исследования на эмбрион, подвергшийся процедуре криоконсервации. Полученные в настоящей работе данные будут являться референсными при изучении истончения блестящей оболочки криоконсервированных эмбрионов, подвергнутых ВЛХ на стадии бластоцисты с помощью фемтосекундных лазерных импульсов.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе были проведены исследования толщины блестящей оболочки эмбрионов мыши как в цикле естественного вылупления (контрольная группа), так и после процедуры ВЛХ (экспериментальная группа). Минимальное термическое воздействие фемтосекундного лазерного излучения позволило осуществить микрохирургическую процедуру на поздней стадии преимплантационного развития — бластоцисте, до начала ее хетчинга. Измерение толщины ZP на стадии бластоцисты (Е3,5) и на стадии вылупления (Е5) позволило оценить коэффициент истончения каждой отдельно взятой оболочки. Проведенный статистический анализ выявил значимые различия в толщине оболочки между экспериментальными и контрольными группами на стадии вылупления бластоцисты — 5,4 и 6,2 мкм соответственно. Также отмечено, что в результате ВЛХ растягивание ZP эмбриона практически отсутствует — толщина ZP составляет 6,6 мкм (Е3,5) и 6,2 мкм (Е5), о чем свидетельствует и медианное значение коэффициента истончения. Считаем, что данное обстоятельство обусловлено снижением порогового значения растягивающих напряжений. Полученные экспериментальные данные послужат основой для сравнения при дальнейшем изучении свойств блестящей оболочки эмбрионов, подвергнутых криоконсервации, а также культивированных в средах различного состава.

Литература

- Ricardo Loret de Mola J, Garside WT, Bucci J, Tureck RW, Heyner S. Analysis of the human zona pellucida during culture: Correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment. *J Assist Reprod Genet.* 1997; 14 (6): 332–6. DOI: 10.1007/BF02765837.
- Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bio Essays.* 1991; 13 (11): 569–74. DOI: 10.1002/bies.950131105.
- Gupta SK. Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans. *J Reprod Immunol.* 2015; 108: 90–7. DOI: 10.1016/j.jri.2014.08.006.
- Dunbar BS. Ovarian Antigens and Infertility. *Am J Reprod Immunol.* 1989; 21 (1): 28–31. DOI: 10.1111/j.1600-0897.1989.tb00994.x.
- Trounson AO, Moore NW. The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida. *Reproduction.* 1974; 41 (1): 97–105. DOI: 10.1530/jrf.0.0410097.
- Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Bashar S, Mandel R, Librach C. Is the zona pellucida thickness of human embryos influenced by women's age and hormonal levels? *Fertil Steril.* 2012; 98 (1): 77–83. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.015.
- Koifman M, Lahav-Baratz S, Shopen L, Idit B, Ishai D, Wiener-Megnazi Z, et al. In Vitro Fertilization Outcomes Following Assisted Hatching of Embryos with Thick Zona Pellucida—A Prospective Randomized Study. *Adv Reprod Sci.* 2014; 2 (4): 76–82. DOI: 10.4236/arsci.2014.24009.
- Seshagiri PB, Sen Roy S, Sireesha G, Rao RP. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *J Reprod Immunol.* 2009; 83 (1–2): 79–84. DOI: 10.1016/j.jri.2009.06.264.
- Tadir Y, Douglas-Hamilton DH. Laser Effects in the Manipulation of Human Eggs and Embryos for In Vitro Fertilization. *Methods Cell Biol.* 2007; 82 (06): 409–31. DOI: 10.1016/S0091-679X(06)82014-5.
- Ситников Д. С., Ильина И. В., Пронкин А. А. Оценка теплового воздействия лазерных импульсов фемто- и миллисекундной длительности при выполнении микрохирургических процедур на эмбрионах млекопитающих. *Квантовая Электроника.* 2022; 52 (5): 482–90.
- Ilina IV, Khramova YV, Ivanova AD, Filatov MA, Silaeva YY, Deykin AV, et al. Controlled hatching at the prescribed site using femtosecond laser for zona pellucida drilling at the early blastocyst stage. *J Assist Reprod Genet.* 2021; 38 (2): 517–29. DOI: 10.1007/s10815-020-01998-x.
- Ilina IV, Khramova YV, Filatov MA, Sitnikov DS. Femtosecond laser is effective tool for zona pellucida engraving and tagging of preimplantation mammalian embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2019; 36 (6): 1251–61. DOI: 10.1007/s10815-019-01424-x.
- Ilina IV, Khramova YV, Filatov MA, Sitnikov DS. Application of femtosecond laser microsurgery in assisted reproductive technologies for preimplantation embryo tagging. *Biomed Opt Express.* 2019; 10 (6): 2985–95. DOI: 10.1364/BOE.10.002985.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update.* 2008; 14 (2): 159–77. DOI: 10.1093/humupd/dm040.
- Sun YP, Xu Y, Cao T, Su YC, Guo YH. Zona pellucida thickness and clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization. *Int J Gynecol Obstet.* 2005; 89 (3): 258–62. DOI: 10.1016/j.ijgo.2005.02.012.
- Lewis EI, Farhadifar R, Farland LV, J. Needleman D, Missmer SA, Racowsky C. Use of imaging software for assessment of the associations among zona pellucida thickness variation, assisted hatching, and implantation of day 3 embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2017; 34 (10): 1261–9. DOI: 10.1007/s10815-017-0978-3.
- Garside WT, de Mola JRL, Bucci JA, Tureck RW, Heyner S. Sequential analysis of zona thickness during in vitro culture of human zygotes: Correlation with embryo quality, age, and implantation. *Mol Reprod Dev.* 1997; 47 (1): 99–104. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<99::AID-MRD13>3.0.CO;2-V.
- Marco-Jiménez F, Naturl-Alfonso C, Jiménez-Trigos E, Lavara R, Vicente JS. Influence of zona pellucida thickness on fertilization, embryo implantation and birth. *Anim Reprod Sci.* 2012; 132 (1–2): 1–10.

- 96–100. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.04.008.
19. Yanez LZ, Han J, Behr BB, Pera RAR, Camarillo DB. Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization. *Nat Commun.* 2016; 7 (1): 10809. DOI: 10.1038/ncomms10809.
 20. Andolfi L, Masiero E, Giolo E, Martinelli M, Luppi S, dal Zilio S, et al. Investigating the mechanical properties of zona pellucida of whole human oocytes by atomic force spectroscopy. *Integr Biol.* 2016; 8 (8): 886–93. DOI: 10.1039/c6ib00044d.
 21. Priel E, Priel T, Szaingurten-Solodkin I, Wainstock T, Perets Y, Zeadna A, et al. Zona pellucida shear modulus, a possible novel non-invasive method to assist in embryo selection during in-vitro fertilization treatment. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 1–10. DOI: 10.1038/s41598-020-70739-y.
 22. Choi JK, Yue T, Huang H, Zhao G, Zhang M, He X. The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification. *Cryobiology.* 2015; 71 (2): 350–5. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2015.08.012.
 23. Илына И. В., Овчинников А. В., Ситников Д. С., Ракитянский М. М., Агранат М. Б., Храмова Ю. В., Семенова М. Л. Применение фемтосекундных лазерных импульсов в биомедицинских клеточных технологиях. *TBT.* 2013; 51 (2): 198–204.
 24. Кириенко К. В., Апрышко В. П., Яковенко С. А. Zona pellucida: строение, функции, свойства (обзор литературы). *Проблемы репродукции.* 2019; 25 (3): 104–12. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.17116/repro201925031104>.
 25. Karimian K, Seydewitz R, Töpfer D, Böl M. Poro-viscoelastic behaviour of the zona pellucida: Impact of three-dimensional modelling on material characterisation. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2022; 131 (March). DOI: 10.1016/j.jmbbm.2022.105211.
 26. Sun Y, Wan KT, Roberts KP, Bischof JC, Nelson BJ. Mechanical property characterization of mouse zona pellucida. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2003; 2 (4): 279–86. DOI: 10.1109/TNB.2003.820273.
 27. Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction.* 2006; 131 (1): 53–61. DOI: 10.1530/rep.1.00878.
- ### References
1. Ricardo Loret de Mola J, Garside WT, Bucci J, Tureck RW, Heyner S. Analysis of the human zona pellucida during culture: Correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment. *J Assist Reprod Genet.* 1997; 14 (6): 332–6. DOI: 10.1007/BF02765837.
 2. Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bio Essays.* 1991; 13 (11): 569–74. DOI: 10.1002/bies.950131105.
 3. Gupta SK. Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans. *J Reprod Immunol.* 2015; 108: 90–7. DOI: 10.1016/j.jri.2014.08.006.
 4. Dunbar BS. Ovarian Antigens and Infertility. *Am J Reprod Immunol.* 1989; 21 (1): 28–31. DOI: 10.1111/j.1600-0897.1989.tb00994.x.
 5. Trounson AO, Moore NW. The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida. *Reproduction.* 1974; 41 (1): 97–105. DOI: 10.1530/jrf.0.0410097.
 6. Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Bashar S, Mandel R, Librach C. Is the zona pellucida thickness of human embryos influenced by women's age and hormonal levels? *Fertil Steril.* 2012; 98 (1): 77–83. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.015.
 7. Koifman M, Lahav-Baratz S, Shopen L, Idit B, Ishai D, Wiener-Megnazi Z, et al. In Vitro Fertilization Outcomes Following Assisted Hatching of Embryos with Thick Zona Pellucida—A Prospective Randomized Study. *Adv Reprod Sci.* 2014; 2 (4): 76–82. DOI:10.4236/arsci.2014.24009.
 8. Seshagiri PB, Sen Roy S, Sireesha G, Rao RP. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *J Reprod Immunol.* 2009; 83 (1–2): 79–84. DOI: 10.1016/j.jri.2009.06.264.
 9. Tadir Y, Douglas-Hamilton DH. Laser Effects in the Manipulation of Human Eggs and Embryos for In Vitro Fertilization. *Methods Cell Biol.* 2007; 82 (06): 409–31. DOI: 10.1016/S0091-679X(06)82014-5.
 10. Sitnikov DS, Ilina IV, Pronkin AA. Assessment of the thermal effect of femtosecond and millisecond laser pulses in microsurgery of mammalian embryos. *Quantum Electron.* 2022; 52 (6): 482–90. DOI: 10.1070/QEL18047.
 11. Ilina IV, Khramova YV, Ivanova AD, Filatov MA, Silaeva YY, Deykin AV, et al. Controlled hatching at the prescribed site using femtosecond laser for zona pellucida drilling at the early blastocyst stage. *J Assist Reprod Genet.* 2021; 38 (2): 517–29. DOI: 10.1007/s10815-020-01998-x.
 12. Ilina IV, Khramova YV, Filatov MA, Sitnikov DS. Femtosecond laser is effective tool for zona pellucida engraving and tagging of preimplantation mammalian embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2019; 36 (6): 1251–61. DOI:10.1007/s10815-019-01424-x.
 13. Ilina IV, Khramova YV, Filatov MA, Sitnikov DS. Application of femtosecond laser microsurgery in assisted reproductive technologies for preimplantation embryo tagging. *Biomed Opt Express.* 2019; 10 (6): 2985–95. DOI: 10.1364/BOE.10.002985.
 14. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update.* 2008; 14 (2): 159–77. DOI: 10.1093/humupd/dmm040.
 15. Sun YP, Xu Y, Cao T, Su YC, Guo YH. Zona pellucida thickness and clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization. *Int J Gynecol Obstet.* 2005; 89 (3): 258–62. DOI: 10.1016/j.ijgo.2005.02.012.
 16. Lewis EI, Farhadifar R, Farland LV, J. Needleman D, Missmer SA, Racowsky C. Use of imaging software for assessment of the associations among zona pellucida thickness variation, assisted hatching, and implantation of day 3 embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2017; 34 (10): 1261–9. DOI: 10.1007/s10815-017-0978-3.
 17. Garside WT, de Mola JRL, Bucci JA, Tureck RW, Heyner S. Sequential analysis of zona thickness during in vitro culture of human zygotes: Correlation with embryo quality, age, and implantation. *Mol Reprod Dev.* 1997; 47 (1): 99–104. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<99::AID-MRD13>3.0.CO;2-V.
 18. Marco-Jiménez F, Naturil-Alfonso C, Jiménez-Trigos E, Lavara R, Vicente JS. Influence of zona pellucida thickness on fertilization, embryo implantation and birth. *Anim Reprod Sci.* 2012; 132 (1–2): 96–100. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.04.008.
 19. Yanez LZ, Han J, Behr BB, Pera RAR, Camarillo DB. Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization. *Nat Commun.* 2016; 7 (1): 10809. DOI: 10.1038/ncomms10809.
 20. Andolfi L, Masiero E, Giolo E, Martinelli M, Luppi S, dal Zilio S, et al. Investigating the mechanical properties of zona pellucida of whole human oocytes by atomic force spectroscopy. *Integr Biol.* 2016; 8 (8): 886–93. DOI: 10.1039/c6ib00044d.
 21. Priel E, Priel T, Szaingurten-Solodkin I, Wainstock T, Perets Y, Zeadna A, et al. Zona pellucida shear modulus, a possible novel non-invasive method to assist in embryo selection during in-vitro fertilization treatment. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 1–10. DOI: 10.1038/s41598-020-70739-y.
 22. Choi JK, Yue T, Huang H, Zhao G, Zhang M, He X. The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification. *Cryobiology.* 2015; 71 (2): 350–5. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2015.08.012.
 23. Ilina IV, Ovchinnikov AV, Sitnikov DS, Rakityansky MM, Agranat MB, Khramova YuV, Semenova ML. Primenenie femtosekundnykh lazernykh impul'sov v biomedicinskix kletochnykh tekhnologiyax. *TVT.* 2013; 51 (2): 198–204.
 24. Kirienko KV, Apyrshko VP, Yakovenko SA. Zona pellucida: stroenie, funkci, svoystva (obzor literatury). *Problemy reprodukcii.* 2019; 25 (3): 104–12. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.17116/repro201925031104>.
 25. Karimian K, Seydewitz R, Töpfer D, Böl M. Poro-viscoelastic behaviour of the zona pellucida: Impact of three-dimensional

- modelling on material characterisation. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2022; 131 (March). DOI: 10.1016/j.jmbbm.2022.105211.
26. Sun Y, Wan KT, Roberts KP, Bischof JC, Nelson BJ. Mechanical property characterization of mouse zona pellucida. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2003; 2 (4): 279–86. DOI: 10.1109/TNB.2003.820273.
27. Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction.* 2006; 131 (1): 53–61. DOI: 10.1530/rep.1.00878.

АДИПОКИНЫ И МИОКИНЫ КАК ИНДИКАТОРЫ ФЕНОТИПОВ ОЖИРЕНИЯ И ИХ СВЯЗЬ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ РАЗНООБРАЗИЯ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА

А. В. Шестопалов^{2,3}, Л. А. Ганенко¹ ✉, Т. В. Григорьева⁴, А. В. Лайков⁴, И. Ю. Васильев⁴, И. М. Колесникова³, Ю. Л. Набока⁴, Н. И. Волкова¹, С. А. Румянцев^{2,3}

¹ Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

² Центр цифровой и трансляционной биомедицины «Центр молекулярного здоровья», Москва, Россия

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

⁴ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Республика Татарстан, Россия

В настоящее время выделяют метаболически здоровое ожирение (МЗО) и метаболически нездоровое ожирение (МНЗО). Жировая и мышечная ткани могут определять фенотип ожирения за счет выработки адипокинов и миокинов. В формировании МЗО участвует и микробное сообщество кишечника. Целью работы было изучить уровни адипокинов и миокинов и их связь с альфа-разнообразием микробиома кишечника при МЗО и МНЗО. Из 265 обследуемых сформированы две группы: здоровые лица и пациенты с ожирением. Последние были разделены на две подгруппы: пациенты с МЗО и пациенты с МНЗО. У обследуемых определяли индекс массы тела, окружность талии, индекс HOMA-IR, уровень адипокинов и миокинов, таксономический состав микробиома кишечника и индексы альфа-разнообразия, оценивали липидный и углеводный обмен. Выявлены статистически значимые различия уровней адипокинов и миокинов, а также их взаимосвязь с показателями разнообразия микробиома кишечника у пациентов с разными фенотипами ожирения. При МЗО и МНЗО уровень адипонектина был значимо ниже ($p < 0,05$), а лептина и аспросина — выше ($p < 0,05$) по сравнению со здоровыми лицами. Пациенты с МНЗО имели уровни адипонектина и лептина более низкие ($p < 0,05$), чем пациенты с МЗО. При МНЗО статистически значимо выше уровень FGF21. Массовый корреляционный анализ при МЗО показал связь между уровнем глюкозы с индексами разнообразия микробиома кишечника, которая отсутствовала при МНЗО, что указывает на утрату влияния микробиоты кишечника на регуляцию уровня глюкозы крови при МНЗО и о различной регуляторной роли микробиоты кишечника в оси «микробиом кишечника — печень — жировая и мышечная ткани» при МЗО и МНЗО. Полученные данные указывают на взаимосвязь между разнообразием микробиома кишечника и фенотипом ожирения.

Ключевые слова: ожирение, метаболически здоровое ожирение, адипокины, миокины, альфа-разнообразие микробиома кишечника

Финансирование: работа выполнена в рамках реализации госконтракта № 0373100122119000041 по проекту «Создание банка биообразцов сыворотки крови и фекалий от здоровых доноров и пациентов с ожирением, метаболическим синдромом, сахарным диабетом II типа, нарушением мукозального барьера желудочно-кишечного тракта с целью выявления кандидатных видонеспецифических медиаторов систем quorum sensing микробиоты человека, модулирующих эндокринную и метаболическую функцию жировой ткани».

Вклад авторов: Л. А. Ганенко — концепция исследования, получение и анализ данных, написание статьи; Н. И. Волкова — планирование и руководство исследованием, редактирование статьи; С. А. Румянцев — дизайн исследования, редактирование статьи; Т. В. Григорьева — работа с базой данных, анализ результатов; А. В. Лайков — анализ данных и интерпретация результатов; И. Ю. Васильев — концепция исследования, редактирование статьи; А. М. Гапонов — анализ литературы, дизайн исследования, редактирование статьи; Ю. Л. Набока — анализ данных и интерпретация результатов, редактирование статьи; А. В. Шестопалов — поиск источников финансирования, работа с массивом данных, статистическая обработка результатов, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО РостГМУ МЗ РФ (протокол № 20/19 от 12.12.2019); все участники исследования подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Лилия Александровна Ганенко
переулок Нахичеванский, дом 29, г. Ростов-на-Дону, 344022, Россия; ganenko.lilia@yandex.ru

Статья получена: 19.12.2022 **Статья принята к печати:** 21.01.2023 **Опубликована онлайн:** 17.02.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.004

ADIPOKINES AND MYOKINES AS INDICATORS OF OBESE PHENOTYPES AND THEIR ASSOCIATION WITH THE GUT MICROBIOME DIVERSITY INDICES

Shestopalov AV^{2,3}, Ganenko LA¹ ✉, Grigoryeva TV⁴, Laikov AV⁴, Vasilyev IYu⁴, Kolesnikova IM³, Naboka YuL⁴, Volkova NI¹, Roumiantsev SA^{2,3}

¹ Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

² Center for Molecular Health, Institute of Digital and Translational Biomedicine, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia

Today, metabolically healthy obesity (MHO) and metabolically unhealthy obesity (MUO) are distinguished. Adipose and muscle tissues can determine the obese phenotype due to adipokine and myokine production. Gut microbial community is also involved in MHO. The study was aimed to reveal the features of adipokine and myokine levels and their association with the gut microbiome alpha diversity in patients with MHO and MUO. A total of 265 subjects were divided into two groups: healthy individuals and obese patients. The latter were divided into two subgroups: patients with MHO and patients with MUO. Body mass index, waist circumference, HOMA-IR, adipokine and myokine levels, gut microbiome taxonomic composition, alpha diversity indices were defined in all the surveyed individuals, lipid and carbohydrate metabolism was also assessed. Significant differences in the adipokine and myokine levels and their association with the gut microbiome diversity indicators were revealed in patients with different obese phenotypes. Patients with MHO and MUO showed significantly lower adiponectin levels ($p < 0.05$) and significantly higher leptin and asprosin levels ($p < 0.05$) than healthy individuals. Patients with MUO had lower adiponectin and leptin levels ($p < 0.05$) than patients with MHO. Significantly higher FGF21 levels were observed in patients with MUO. Large-scale correlation analysis revealed the relationship between the glucose levels and the gut microbiome diversity indices that was missing in patients with MUO. This indicated the loss of the microbiota diversity effects on the blood glucose control in individuals with MUO, as well as different regulatory roles in the gut microbiome–liver–muscle/adipose tissue axes of individuals with MHO and MUO played by gut microbiota. The findings show the relationship between the gut microbiome diversity and the obese phenotype.

Keywords: obesity, metabolically healthy obesity, adipokines, myokines, gut microbiome alpha diversity

Funding: the study was conducted as part of the State Assignment № 0373100122119000041, the project "Creation of a bank of blood serum and fecal samples from healthy donors and patients with obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, impaired mucosal barrier of the gastrointestinal tract with the aim of identifying candidate species-specific mediators of quorum sensing microbiota systems human modulating endocrine and metabolic function of adipose tissue".

Author contribution: Ganenko LA — study concept, data acquisition and analysis, manuscript writing; Volkova NI — research planning and management, manuscript editing; Roumiantsev SA — study design, manuscript editing; Grigoryeva TV — working with the database, analysis of the results; Laikov AV — data analysis and interpretation of the results; Vasilyev IYu — study concept, manuscript editing; Gaпonov AM — literature review, study design, manuscript editing; Naboka YuL — data analysis and interpretation of the results, manuscript editing; Shestopalov AV — search for sources of funding, working with data sets, statistical data processing, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Rostov State Medical University (protocol № 20/19 of 12 December 2019); the informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Lilia A. Ganenko
Nakhichevansky pereulok, 29, Rostov-on-Don, 344022, Russia; ganenko.lilia@yandex.ru

Received: 19.12.2022 **Accepted:** 21.01.2023 **Published online:** 17.02.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.004

Осложнения, связанные с ожирением, снижают качество и продолжительность жизни [1]. Однако ожирение не всегда сопровождается метаболическими нарушениями, в связи с чем выделяют метаболически здоровое ожирение (МЗО) и метаболически нездоровое ожирение (МНЗО) [2]. Распространенность МЗО составляет 6–60% среди пациентов с ожирением в зависимости от критериев диагностики МЗО [3]. Классификация ожирения по уровню ИМТ не дает полного представления о состоянии здоровья и потенциальном риске будущих неблагоприятных исходов, что было отражено в рекомендациях AACE/ACE (The American Association of Clinical Endocrinologists and the American College of Endocrinology, США, 2014 г.), предлагающих при классификации ожирения учитывать в том числе и метаболический статус [4]. Жировая и мышечная ткани играют важную роль в поддержании метаболического гомеостаза путем секреции биологически активных пептидов — адипокинов и миокинов [5]. Дисбаланс этих повышающих и понижающих инсулиносенситивность и адипогенез адипокинов и миокинов может способствовать развитию метаболических осложнений, таких как инсулинорезистентность, вялотекущее воспалительное ремоделирование жировой ткани, внеклеточное депонирование липидов, атеросклероз и др. [6]. Известно, что адипонектин оказывает инсулинсенсбилизирующее, антиатерогенное и противовоспалительное действие [7]. В то время как адипокины лептин и резистин, наоборот, представляют собой потенциальные факторы инсулинорезистентности, оказывающие плейотропное действие на потребление пищи, нейроэндокринную регуляцию гипоталамуса, репродуктивную функцию и энергетический обмен [8]. Данные по недавно обнаруженному адипокину аспросину крайне фрагментарны: есть предположения, что он способен оказывать влияние на метаболизм глюкозы и, вероятно, связан с ожирением и что его уровень может быть маркером ранней диагностики сахарного диабета [9]. Информация о роли миокина миостатина в патогенезе ожирения и инсулинорезистентности в настоящее время ограничена. Некоторые авторы предлагают использовать миостатин для идентификации МНЗО [10]. Инсулинчувствительный миокин FGF21 действует как метаболический регулятор, участвующий в контроле гомеостаза глюкозы [11]. В последнее время интерес у исследователей вызывает секретируемый фибробластами и остеобластоподобными клетками пептид остеокин. Его патофизиологическая роль малоизучена [12]. Единичные результаты у пациентов с ожирением и инсулиновой резистентностью продемонстрировали более высокий его уровень по сравнению со здоровыми обследуемыми [13]. В последнее десятилетие микробиоту кишечника рассматривают в качестве фактора, влияющего на развитие ожирения. Микробиота может влиять на метаболический фенотип как путем прямого воздействия на доступность энергии и питательных веществ, так и посредством модуляции сигнальных и метаболических путей макроорганизма. Появляется все больше данных, что для оптимального симбиотического взаимодействия с макроорганизмом и предотвращения развития в том числе внекишечных заболеваний необходимы баланс и разнообразие микроорганизмов [14]. Разнообразие микробиома отражает количество различных видов бактерий в нем. Выделяют два вида разнообразия: альфа-разнообразие (в пределах одного биотопа) и бета-разнообразие (между отдельными биотопами).

Альфа-разнообразие оценивают по индексам Chao 1, Шеннона, Симпсона (прямой и обратный), Джини Симпсона и Бергера-Паркера. Индекс Chao 1 используют для определения меры наблюдаемого/скрытого разнообразия, индекс Шеннона — для определения меры разнообразия и плавности микробиома (более высокое значение данных индексов соответствует большему разнообразию); индекс Симпсона описывает вероятность принадлежности любых двух особей, случайно отобранных из неопределенно большого сообщества, к разным видам, по мере увеличения его значения разнообразие уменьшается; индекс Бергера-Паркера выражает меру доминирования вида в микробиоме, чем выше его значение, тем меньше альфа-разнообразия [15]. Предыдущие исследования показали, что микробиом кала людей с ожирением менее разнообразен, чем у худых людей [16]. Показано также снижение микробного разнообразия у 75% пациентов с морбидным ожирением и у 40% — с ожирением I и II степени [17, 18]. Некоторые авторы обнаружили прямую корреляцию между снижением разнообразия микробиома кишечника и МНЗО [19]. Несмотря на то что число исследований, оценивающих роль адипокинов и миокинов в формировании МЗО, а также их взаимосвязь с показателями разнообразия микробиома кишечника ограничены, описанные в литературе ассоциации между адипонектином, резистином и FGF21 с МЗО [5, 6] легли в основу научной гипотезы данного исследования — разные профили адипокинов и миокинов могут способствовать диссоциации ожирения на фенотипы. Цель исследования — выявить особенности уровней адипокинов и миокинов и их связь с показателями разнообразия микробиома кишечника у пациентов с разными фенотипами ожирения.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на базе ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» МЗ РФ, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и центра цифровой и трансляционной биомедицины ООО «Центр молекулярного здоровья». Набор пациентов проводили с 2019 по 2020 г. Все обследуемые были разделены на две основные группы в зависимости от индекса массы тела (ИМТ) и окружности талии (ОТ): в группу 1 были включены здоровые лица (контрольная), в группу 2 — пациенты с ожирением. Далее группа 2 была разделена на две подгруппы в зависимости от наличия метаболических осложнений: в подгруппу 2а вошли пациенты с МЗО, в подгруппу 2б — с МНЗО. Критерии включения: возраст старше 18 лет; отсутствие приема антибиотиков, пре- и пробиотических препаратов в течение трех месяцев до включения в исследование. Дополнительные критерии включения в группу 1: $18,5 \text{ кг/м}^2 < \text{ИМТ} \leq 24,9 \text{ кг/м}^2$; отсутствие дислипидемии, гипергликемии и артериальной гипертензии (АГ). Дополнительные критерии включения в группу 2: $\text{ИМТ} \geq 30 \text{ кг/м}^2$, ОТ у мужчин $> 102 \text{ см}$, у женщин $> 88 \text{ см}$. В подгруппу 2а были включены пациенты, имеющие < 3 критериев а в подгруппу 2б ≥ 3 критериев NCEP-ATP III (The National Cholesterol Education Program (NCEP), Adult Treatment Panel III (ATPIII)), включающие следующие показатели: систолическое артериальное давление (САД) > 130 и/или диастолическое артериальное давление (ДАД) $> 85 \text{ мм рт. ст.}$, глюкоза плазмы натощак (ГПН) $\geq 6,1 \text{ ммоль/л}$, триглицериды (ТГ) $\geq 1,7 \text{ ммоль/л}$, липопротеиды высокой плотности (ХС ЛПВП) $< 1,29$

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика обследуемых групп 1 и 2

Показатели	Группа 1 n = 129	Группа 2 n = 136	p
Мужчины	15 (11,6%)	28 (20,6%)	0,621
Женщины	114 (88,3%)	108 (79,4%)	0,613
Возраст/лет	39,6 ± 4,2	54,6 ± 4,7	0,032
ИМТ, кг/м ²	20,8 [19; 23]	34 [31; 36]	0,024
ОТ, см	74 [69; 75,5]	100 [95; 103]	0,011
САД, мм рт. ст.	120,5 [90; 125]	135 [125; 145]	0,034
ДАД, мм рт. ст.	74,5 [60; 90]	85 [80; 90]	0,001
ГПН, ммоль/л	3,96 [4,05; 5,1]	5,57 [5,1; 6,93]	0,0001
ОХС, ммоль/л	4,5 [4,1; 5,0]	5,42 [4,62; 6,2]	0,624
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,11 [2,4; 3,21]	3,19 [2,6; 3,64]	0,745
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,93 [1,49; 2,24]	1,23 [1,11; 1,39]	0,031
ТГ, ммоль/л	0,79 [0,57; 1,13]	1,65 [1,33; 2,34]	0,001
Инсулин, пг/мл	262 [133,6; 418,2]	390 [170,02; 678,78]	0,001
НОМА-IR	1,86 [1,47; 2,82]	11,7 [5,08; 19,3]	0,001

Примечание: ИМТ — индекс массы тела, ОТ — окружность талии, САД — систолическое артериальное давление, ДАД — диастолическое артериальное давление, ОХС — общий холестерин, ХС ЛПНП — липопротеины низкой плотности, ХС ЛПВП — липопротеины высокой плотности, ТГ — триглицериды, НОМА-IR — Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance.

(женщины), < 1,03 (мужчины), окружность талии (ОТ) > 102 см (мужчины), > 88 см (женщины). Критерии исключения: наличие тяжелых соматических заболеваний, любые заболевания желудочно-кишечного тракта, острые состояния, депрессия, алкоголизм, беременность.

Дизайн исследования

Проведено когортное исследование. Все обследуемые прошли клинический опрос и осмотр, оценку антропометрических показателей; всем выполнено анкетирование и лабораторное обследование по следующим показателям: глюкоза плазмы натощак (ГПН), общий холестерин (ОХС), липопротеиды низкой плотности (ХС ЛПНП), липопротеиды высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицериды (ТГ), адипонектин, лептин, аспросин, резистин, фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), ирисин, фактор роста фибробластов 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21), миоастатин, остеокрин и инсулин; рассчитан индекс инсулинорезистентности НОМА-IR, определен состав микробиома кишечника и рассчитаны индексы альфа-разнообразия по флотипам бактерий. Измерение уровня артериального давления проводили с помощью ручного тонометра (Little Doctor LD-60; КНР) по стандартной методике Н. С. Короткова. Биохимические показатели (ммоль/л) ГПН, ХС ЛПВП, ХС ЛПНП, ТГ, ОХС исследовали фотометрическим методом на спектрофотометре Hitachi U-2900 (Hitachi; Япония) наборами реагентов «Ольвекс Диагностикум» (Россия). Количественный анализ (нг/мл) адипонектина, лептина, резистина, аспросина, VEGF, ирисина, миоастатина, FGF21, остеокрина и инсулина выполняли методом мультиплексного иммуноферментного анализа (ИФА) на анализаторе Magpix (BioRad; США) с использованием наборов фирмы Milliplex (США). Концентрацию аспросина определяли методом ИФА при помощи тест-системы ELISA KitForAsprosin (Cloud-Clone; США). Сбор образцов фекалий проводили согласно справочному пособию под редакцией В. В. Меньшикова

[20]. Определение состава кишечного микробиома выполняли методом NGS-секвенирования бактериальной ДНК по гену 16s рРНК (V3-V4 варибельный регион) на платформе MiSeq (Illumina; США) в режиме парноконцевого прочтения (2 × 300). Для характеристики микробиоты использовали различные индексы альфа-разнообразия бактериального сообщества.

Статистический анализ

Для обработки использовали статистическую программу R (версия 3.2, R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria). Для количественных показателей рассчитывали средние ± средние квадратические отклонения; медиану и квартили (25%, 75%); минимальные и максимальные значения в выборке. Сравнение средних уровней в группах проводили с помощью теста Манна-Уитни. Сравнение медиан изучаемых показателей проводили с помощью теста Краскала-Уоллиса, корреляционный анализ — с применением коэффициента корреляции Спирмена. Различия признавали статистически значимыми на уровне $p < 0,05$. Кластерный анализ: массовый корреляционный анализ проводили на языке Python v3.8 для каждой группы пациентов между:

- 1) ИМТ, ОТ, САД, ДАД, ГПН, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ТГ, ОХС и показателями содержания адипокинов и миокинов;
- 2) каждым показателем клинических данных и показателями микробиоты (альфа-разнообразие: видовое богатство (число оперативных таксономических единиц (OTU) с ненулевой представленностью), энтропия Шеннона, индекс преобладания Бергера-Паркера, прямой и обратный индексы Симпсона, индекс Джини-Симпсона, индекс Chao1;
- 3) показателями микробиома и показателями содержания адипокинов и миокинов.

Полученные матрицы коэффициентов ранговой корреляции Спирмена далее кластеризовали между собой в пределах каждой группы пациентов по расстоянию Манхэттена.

Таблица 2. Клинико-лабораторная характеристика пациентов подгрупп 2а и 2б

Показатели	Подгруппа 2а n = 40	Подгруппа 2б n = 55	p
Мужчины	6 (15%)	11 (20%)	0,612
Женщины	34 (85%)	44 (80%)	0,51
Возраст, лет	49,05 ± 5,1	51,3 ± 3,6	0,734
ИМТ, кг/м²	33 [31; 36]	33 [31; 36]	0,591
ОТ, см	100 [96; 104]	100 [93; 102]	0,112
САД, мм рт. ст.	120 [110; 125]	145 [136; 150]	< 0,0001
ДАД, мм рт. ст.	75 [70; 80]	90 [90; 95]	< 0,0001
ГПН, ммоль/л	4,88 [4,57; 5,28]	7,2 [6,14; 8,62]	< 0,0001
НОМА-IR	7,48 [3,3; 12]	14,4 [7,57; 27,37]	0,0003
ОХС, ммоль/л	5,08 [4,31; 6,01]	5,74 [4,57; 6,5]	0,102
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,18 [2,78; 3,53]	3,1 [1,95; 3,79]	0,341
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,3 [1,21; 1,47]	1,2 [1,08; 1,45]	0,022
ТГ, ммоль/л	1,19 [0,91; 1,46]	2,39 [1,77; 3,16]	< 0,0001
Инсулин, пг/мл	284,92 [142,25; 529,07]	389,96 [221; 721,57]	0,05

Примечание: ИМТ — индекс массы тела, ОТ — окружность талии, САД — систолическое артериальное давление, ДАД — диастолическое артериальное давление, ОХС — общий холестерин, ХС ЛПНП — липопротеины низкой плотности, ХС ЛПВП — липопротеины высокой плотности, ТГ — триглицериды, НОМА-IR — Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance.

Доступность данных

Скрипты кластерного анализа данных находятся в открытом доступе в репозитории GitHub: https://github.com/ivasilyev/curated_projects/tree/master/ashestopalov/nutrition/obesity_elisa

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-лабораторная характеристика обследуемых групп 1 и 2 представлена в табл. 1.

Контрольная группа и пациенты с ожирением были сопоставимы по половому признаку, уровню ОХС и ХС ЛПНП. При этом обследуемые группы 1 были моложе ($p = 0,032$), имели более низкое значение ИМТ ($p = 0,024$) и ОТ ($p = 0,011$). Также у пациентов с ожирением уровень САД, ДАД, ТГ, ГПН, инсулина и НОМА были выше ($p < 0,05$), а ХС ЛПВП — ниже ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Клинико-лабораторная характеристика пациентов подгрупп 2а и 2б представлена в табл. 2.

Подгруппы 2а и 2б были сопоставимы по количеству мужчин и женщин, возрасту обследуемых, ИМТ и ОТ. При проведении сравнительного анализа между пациентами с разными фенотипами ожирения значимые различия были выявлены по ряду показателей: значения САД, ДАД,

ТГ, ГПН, инсулина и НОМА были выше ($p < 0,05$), а ХС ЛПВП ниже ($p < 0,05$) в подгруппе МНЗО по сравнению с МЗО. Обращает на себя особое внимание наличие у пациентов подгруппы 2б гипергликемии, значение которой соответствует уже сахарному диабету, а не более раннему нарушению углеводного обмена — предиабету, в то время как в подгруппе 2а наблюдается нормогликемия, несмотря на наличие инсулиновой резистентности в обеих подгруппах. В подгруппе 2б примечательно более чем двукратное повышение уровня триглицеридов в крови, свидетельствующее о нарушении их депонирования вследствие развития инсулинорезистентности жировой ткани, что приводит к «липотоксичности» — внеклеточному накоплению триглицеридов.

При проведении сравнительного анализа уровней адипокинов и миокинов у обследуемых групп 1 и 2 выявлены статистически значимые различия в содержании адипонектина, лептина и аспросина. У пациентов с ожирением уровень адипонектина был ниже ($p < 0,05$), а лептина и аспросина — выше ($p < 0,05$) по сравнению со здоровыми лицами (табл. 3). Известно, что лептин является ключевым медиатором между жировой тканью и гипоталамо-гипофизарной системой, обладающим оксигенным эффектом. Высокий уровень лептина в группе ожирения свидетельствует о торможении

Таблица 3. Содержание адипокинов, миокинов в сыворотке крови у здоровых лиц и пациентов с ожирением

Показатели	Группа 1 n = 129	Группа 2 n = 136	p
Адипонектин, нг/мл	2149800 [62542; 6457800]	591180 [22366; 6457800]	0,05
Лептин, пг/мл	3999,96 [1120,19; 10099,7]	11291,99 [5541,55; 17827,94]	< 0,0001
Резистин, пг/мл	52364,75 [32515,5; 116732]	46147,46 [27968,18; 104077,3]	0,35
Аспросин, пг/мл	0,18 [0; 0,36]	0,35 [0; 0,54]	0,01
VEGF, пг/мл	73,18 [44,93; 139,3]	58,45 [35,45; 143,28]	0,19
Инсулин, пг/мл	262 [133,6; 418,2]	390 [170,02; 678,78]	0,001
Остеокрин, пг/мл	55,23 [37,7; 74,28]	45,23 [34,15; 69,60]	0,14
Миостатин, пг/мл	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0,6
Ирисин, пг/мл	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0,58
FGF21, пг/мл	0 [0; 56,86]	0 [0; 83,45]	0,14

Таблица 4. Содержание адипокинов и миокинов в сыворотке крови у обследуемых группы 1, подгрупп 2а и 2б

Показатели	Группа 1 n = 129	Подгруппа 2а n = 40	p_{1p1-2a}	Подгруппа 2б n = 55	P_{1p1-2b}	p_{2a-2b}
Адипонектин, нг/мл	214980 [62542; 6457800]	75 618 [25132; 6457800]	< 0,052	57 891 [22616,75; 2606600]	< 0,054	0,003
Лептин, пг/мл	3999,96 [1120,19; 10099,7]	13808,18 [6332,91; 17956,46]	< 0,051	9942,72 [4664,47; 16802,91]	< 0,055	0,002
Инсулин, пг/мл	262 [133,6; 418,2]	284 [142,25; 529,07]	0,1	389 [221,22; 721,57]	< 0,054	0,05
Аспросин, пг/мл	0,18 [0; 0,36]	0,46 [0,23; 0,6]	< 0,05	0,38 [0; 0,57]	< 0,05	0,37
FGF21, пг/мл	0 [0; 56,8]	0 [0; 31,44]	< 0,01	13,98 [0; 90,49]	0,05	0,05
Резистин, пг/мл	52364,75 [32515,5; 116732]	48637,48 [33229,66; 97603,33]	0,5	43421,05 [26433,69; 109927,65]	0,6	0,7
VEGF, пг/мл	73,18 [44,93; 139,3]	56,33 [19,89; 145,32]	< 0,05	58,97 [39,61; 163,05]	0,26	0,34
Остеокрин, пг/мл	55,23 [37,7; 74,28]	44,03 [35,91; 59,08]	0,16	48,96 [32,22; 78,6]	0,17	0,57
Миостатин, пг/мл	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0,23	0 [0; 0]	0,3	0,6
Ирисин, пг/мл	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0,34	0 [0; 0]	0,26	0,7

орексигенного влияния лептина вследствие формирования резистентности к его сигналам в центральной нервной системе, т. е. о формировании лептинорезистентности, которая характеризуется снижением чувства сытости, чрезмерным потреблением питательных веществ и увеличением общей массы тела.

При сравнении уровней адипокинов и миокинов в сыворотке крови у пациентов с МЗО, МНЗО и здоровыми донорами обнаружены выявленные ранее тенденции: при МЗО и МНЗО уровень адипонектина был значимо ниже ($p < 0,05$), а лептина и аспросина — выше ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Причем пациенты с МНЗО имели более низкий ($p < 0,05$) уровень адипонектина и лептина, чем пациенты с МЗО. При МНЗО было также обнаружено статистически значимое возрастание уровней FGF21 (табл. 4). Снижение уровня адипонектина укладывается в общую картину развития инсулинорезистентности с учетом его инсулиносенситивного действия. Парадоксальное, на первый взгляд, более низкое содержание лептина у пациентов с МНЗО, вероятно, является следствием инсулинорезистентности жировой ткани, приводящей к нарушению процессов терминальной дифференцировки адипоцитов, нарушению внутриклеточного депонирования триглицеридов и липотоксичности.

Корреляционный анализ показал наличие у здоровых доноров положительной корреляции между уровнями адипонектина и резистина ($r = 0,428$; $p = 0,001$), FGF21 и миостатина ($r = 0,543$; $p = 0,001$), а также инсулина и лептина ($r = 0,429$; $p = 0,0001$), что свидетельствует о нормальном балансе в системе регуляции инсулиносенситивности и эндокринной функции жировой и мышечной тканей.

У пациентов с ожирением выявлена положительная корреляция между уровнем адипонектина с содержанием инсулина ($r = 0,3$; $p = 0,008$), лептина ($r = 0,3$; $p = 0,008$), резистина ($r = 0,5$; $p < 0,0001$) и VEGF ($r = 0,49$; $p < 0,0001$). Значимые корреляционные связи обнаружены также между содержанием миокина FGF21 с миостатином ($r = 0,37$; $p = 0,0001$), инсулина с лептином ($r = 0,84$; $p < 0,0001$).

Уровень лептина коррелировал также с содержанием VEGF ($r = 0,38$; $p = 0,002$), а резистина с остеокином ($r = 0,33$; $p = 0,0006$). Данная картина корреляционных связей свидетельствует о дисбалансе в системе регуляции и вовлечения в систему регуляции фактора гипоксии, так как появляются положительные связи адипонектина с лептином и лептина с VEGF.

У пациентов с МЗО выявлены корреляции с уровнем остеокина — отрицательная с аспросином ($r = -0,43$; $p = 0,02$) и резистином ($r = -0,39$; $p = 0,01$) и положительная — с адипонектином ($r = 0,43$; $p = 0,04$). Установлена связь между уровнями адипонектина и миостатина ($r = 0,34$; $p = 0,035$), инсулина и лептина ($r = 0,59$; $p < 0,0001$), а также между FGF21 с адипонектином ($r = 0,34$; $p = 0,0003$).

При МНЗО обнаружены корреляции остеокина с аспросином ($r = -0,38$; $p = 0,04$), резистином ($r = 0,48$; $p = 0,001$) и миостатином ($r = 0,33$; $p = 0,03$). Прямые значимые корреляционные связи идентифицированы между FGF21 и миостатином ($r = 0,37$; $p = 0,005$), инсулином и лептином ($r = 0,37$; $p = 0,005$). Таким образом, при развитии ожирения наблюдается возрастание роли остеокина в регуляции гормональной функции жировой и мышечной тканей. У здоровых людей корреляции с остеокином отсутствовали, в группе МЗО остеокин формирует две корреляции с адипокинами аспросином и резистином, а в группе МНЗО — три, расширяя свой спектр до миокина миостатина. В итоге при ожирении формируются взаимосвязанные изменения всех трех ветвей дифференцировки мезенхимных стволовых клеток — адипогенной, миогенной и остеогенной. Надо отметить, что положительная корреляция между инсулином и лептином отмечается во всех исследуемых группах. Она максимальна в группе МЗО, что свидетельствует о сохранном действии инсулина на жировую ткань, и минимальна в группе МНЗО, что может служить косвенным признаком развития инсулинорезистентности жировой ткани. Примечательно также изменение регуляторного влияния FGF21 по мере развития ожирения. У здоровых доноров и пациентов с МНЗО этот миокин положительно коррелирует с другим

Таблица 5. Характеристики альфа-разнообразия микробиома кала у исследуемых групп пациентов

Индексы	Группа 1 (контрольная)	Группа 2 (ожирения)	Подгруппа 2а (МЗО)	Подгруппа 2б (МНЗО)
Индекс Симпсона	0,981 [0,979–0,982]	0,977 [0,975–0,981]	0,978 [0,971–0,986]	0,976 [0,973–0,981]
Индекс Шеннона	7,80 [7,71–7,90]	7,82 [7,63–8,11]	8,28* [7,67–8,76]	7,63† [7,46–7,90]
Индекс Chao1	4010,16 [3871,53–4256,37]	4018,56* [3647,52–4492,64]	4899,13* [4139,88–5384,25]	3631,75† [3214,01–4118,26]
Количество OTU	1974,50 [1865,86–2060,00]	2015,00 [1930,17–2285,94]	2479,00* [1982,88–2727,61]	1930,00† [1743,64–2125,33]

Примечание: данные представлены в виде медианы и ее 95%-го доверительного интервала; * — различия достоверны по сравнению с группой 1 ($p < 0,05$); † — различия достоверны по сравнению с МЗО ($p < 0,05$)

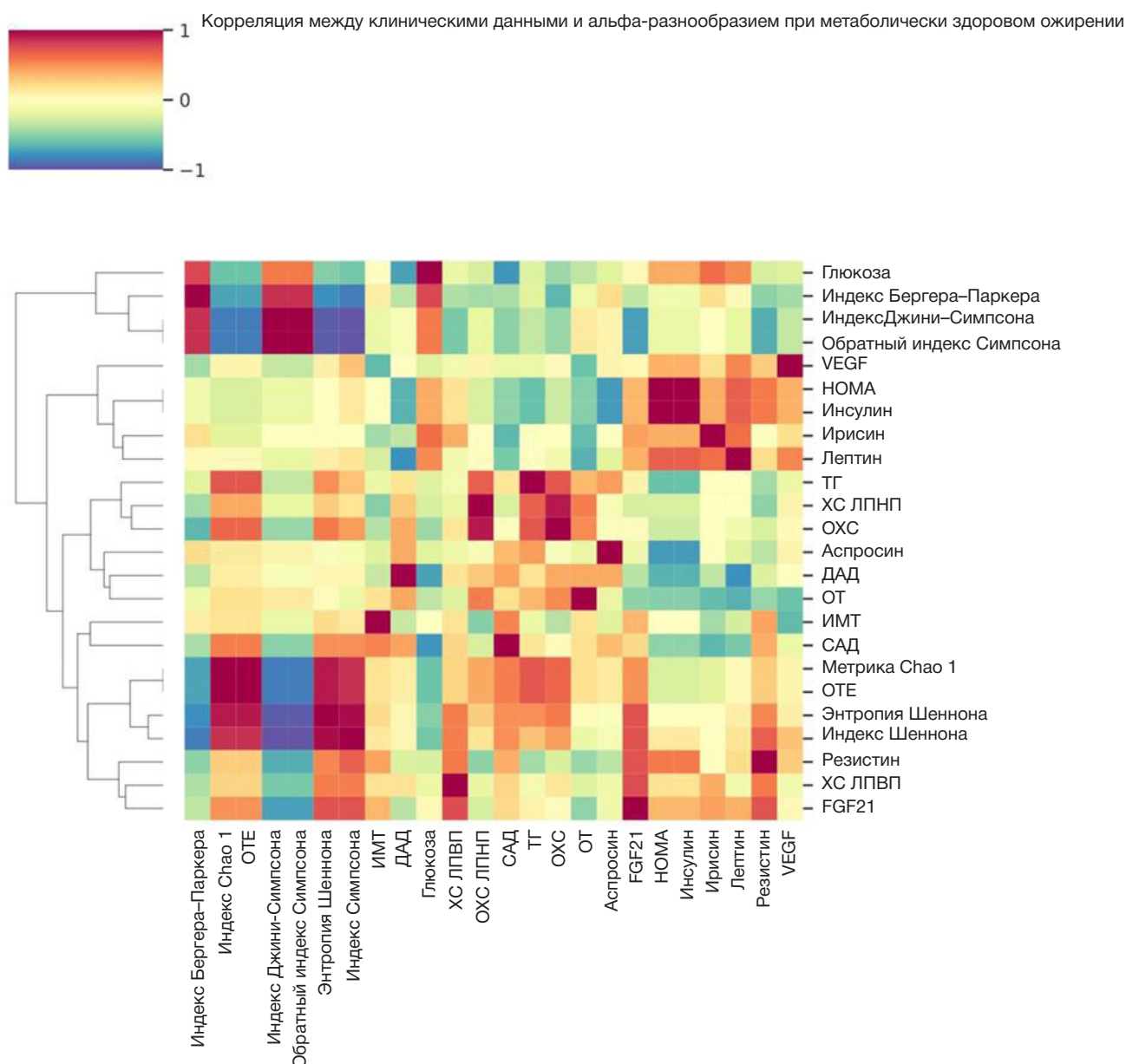


Рис. 1. Кластермэп корреляционного анализа для группы пациентов с МЗО между глюкозой, адипокинами, миокинами, липидограммой и показателями разнообразия микробиома кишечника

миокином миостатином, а при МЗО — с адипонектином и миостатином. Возможно, что регуляторная ось «FGF21–адипонектин» является одним из механизмов компенсации в системе «жировая ткань — мышечная ткань», позволяющая сохранить инсулиночувствительность жировой ткани при ожирении и предотвратить липотоксичность.

Для оценки альфа-разнообразия бактериального сообщества в обследуемых группах были вычислены значения индексов филогенетического разнообразия Симпсона, Шеннона, Chao1 и количество OTUs. Значимые различия между группами контроля и пациентов с ожирением были обнаружены для индекса филогенетического разнообразия и индекса Chao1, что свидетельствует о снижении альфа-разнообразия в образцах кала пациентов с ожирением. При этом индекс Шеннона не различался между группами 1 и 2 [21, 22].

Следует обратить внимание, что при МЗО индексы Шеннона, Chao1 и общее количество OTU статистически значимо выше в сравнении не только с группой МНЗО, но и с группой здоровых доноров. Вероятно, что повышение

альфа-разнообразия является протективным механизмом микробного сообщества, предотвращающим развитие метаболических нарушений при ожирении.

Для подгрупп 2а и 2б был выполнен массовый корреляционный анализ, с помощью которого выявлено наличие характерных для каждого фенотипа ожирения положительно связанных ($r \geq 0,3$) кластеров корреляций. Так, для подгруппы пациентов с фенотипом МЗО характерна следующая кластеризация: 1) корреляции уровня глюкозы с обратными индексами разнообразия микробиома кишечника (индекс Бергера–Паркера, Джини Симпсона, обратный индекс Симпсона); 2) корреляции уровней лептина, инсулина, ирисина и значения НОМА с концентрацией VEGF; 3) корреляции концентрации FGF21 и ХС ЛПВП с прямыми индексами разнообразия кишечного микробиома (Chao1, количество OTU, индекс Шеннона, Симпсона) (рис. 1).

Кластеризация корреляции уровня глюкозы с обратными индексами разнообразия микробиома кишечника демонстрирует взаимосвязь между

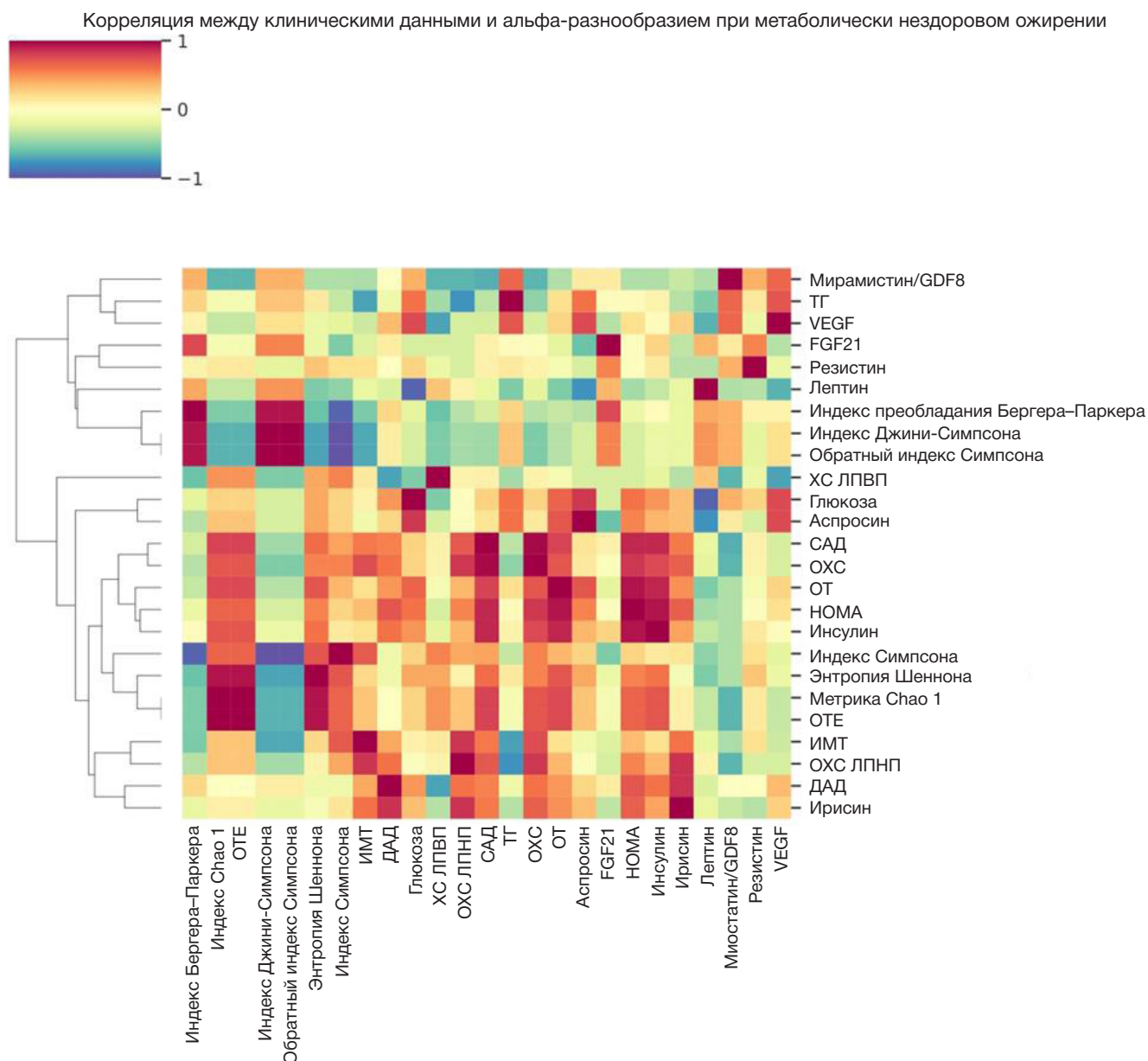


Рис. 2. Кластермэп корреляционного анализа для группы пациентов с МНЗО между глюкозой, адипокинами, миокинами, липидограммой и показателями разнообразия микробиома кишечника

микробиотой и уровнем глюкозы и указывает на то, что при МЗО микробиота кишечника влияет на концентрацию глюкозы и, вероятно, удерживает ее уровень в нормальном диапазоне, несмотря на наличие ожирения. Кластеризация корреляции VEGF с показателями углеводного обмена и инсулиночувствительности демонстрирует, что гипоксия оказывает регуляторное влияние при МЗО. Кластеризация корреляционных связей прямых индексов разнообразия кишечного микробиома с FGF21, ХС ЛПВП свидетельствует о протективном эффекте микробного разнообразия при этом фенотипе ожирения, вероятно, вследствие сохранности регуляторной оси «микробиота – печень – жировая ткань».

Важно отметить, что для пациентов с фенотипом МНЗО не было выявлено характерной для МЗО кластеризации показателей разнообразия микробиома кишечника с уровнем глюкозы, что указывает на утрату влияния микробиоты кишечника на регуляцию уровня глюкозы крови (рис. 2). Более того, при МНЗО обратные индексы разнообразия имели высокую

взаимосвязь с ИМТ, САД, ДАД, ХС ЛПНП, ОХС, НОМА-IR и инсулином, а прямые индексы разнообразия кишечного микробиома продемонстрировали высокую корреляцию с миостатином, ТГ, VEGF, FGF21, резистином и лептином. Это свидетельствует о том, что снижение разнообразия микробного сообщества кишечника при данном типе ожирения напрямую связано с клиническими и биохимическими проявлениями метаболического синдрома и сахарного диабета 2-го типа.

Полученные данные свидетельствуют о различной регуляторной роли микробиоты кишечника в оси «микробиом кишечника – печень – жировая и мышечная ткани» при фенотипах ожирения и появлении патологических взаимосвязей при МНЗО.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Роль микробного сообщества и эндокринных факторов жировой и мышечной тканей в развитии ожирения исследована достаточно полно [2, 4, 5]. Однако эти

исследования практически не затрагивали различий между фенотипами ожирения и взаимосвязи показателей микробиома с показателями адипокинов и миокинов. Проведенное нами исследование выявило характерные для ожирения изменения профиля адипокинов и миокинов в сыворотке крови в виде значимого снижения уровня адипонектина на фоне повышения содержания инсулина, лептина и аспросина, что в целом отражает развитие инсулинорезистентности, лептинорезистентности и соответственно нарушение депонирующей функции жировой ткани и регуляции аппетита. Снижение адипонектина согласуется с данными других авторов [1, 6]. Аналогичные закономерности показаны ранее и для уровней лептина и инсулина [1, 23]. Более высокий уровень адипонектина и более низкий уровень лептина у здоровых лиц, вероятно, связан с отсутствием терминальной гипертрофии адипоцитов и сохраненной функцией депонирования и их метаболической пластичностью. Поэтому такие адипоциты должны характеризоваться высокой инсулиносенситивностью. В то же время при ожирении можно наблюдать и гиперплазию и гипертрофию адипоцитов, цитоплазма которых полностью заполняется ТГ, что по принципу отрицательной обратной связи вызывает блокирование дальнейшего депонирования ТГ и, как следствие, нарушение их метаболической пластичности [24]. В результате такого ремоделирования происходит эктопическое отложение жира и изменяется морфология адипоцитов, что является триггером развития инсулиновой резистентности, сопровождающейся снижением уровня адипонектина и повышением лептина. Повышенный уровень лептина, вероятно, связан с формированием лептинорезистентности, при которой меньшее количество лептина достигнет мозга, что приведет к снижению активации сигнального пути для регулирования массы тела. Резистентность к лептину на уровне ГЭБ объясняется эффектами насыщения рецепторов, вызванными избытком лептина или обратимым ингибированием, вызванным циркулирующими факторами, такими как ТГ [25].

Информация о роли аспросина в развитии ожирения крайне фрагментарна [26]. Результаты данного исследования показали более высокий уровень аспросина у пациентов с ожирением по сравнению со здоровыми лицами. В проведенном исследовании уровень аспросина при ожирении выше по сравнению со здоровыми лицами. Известно, что аспросин секретируется белой жировой тканью и повышает аппетит. Поскольку при ожирении увеличивается количество адипоцитов, соответственно происходит повышение уровня аспросина, что в свою очередь приводит к активации орексигенных нейронов агути-родственным белком (AgRP) и повышению аппетита, формируя порочный круг [27]. Поэтому есть предположение, что аспросин может способствовать развитию ожирения, частично влияя на количество потребляемой пищи.

Для МЗО характерны изменения, аналогичные для ожирения в целом, но с минимальными проявлениями липотоксичности. Характерная особенность этого фенотипа — максимальные уровни лептина, максимальный уровень корреляции между инсулином и лептином и наличие взаимосвязи между FGF21 и адипонектином. Это свидетельствует, с одной стороны, о сохранном действии инсулина на жировую ткань, а с другой — активации регуляторного механизма FGF21–адипонектин, позволяющего, вероятно, сохранить инсулиносенситивность жировой ткани при данном фенотипе ожирения и

предотвратить липотоксичность. Взаимосвязь показателей разнообразия микробного сообщества кишечника с клиническими и лабораторными показателями свидетельствует о причастности микробиоты к регуляции уровня глюкозы и протективном характере показателей разнообразия в отношении показателей обмена холестерина, что, вероятно, свидетельствует о сохранности регуляторной оси «микробиота – печень – жировая ткань».

Ранее нами было выявлено, что изменения в содержании основных представителей микробиома Bacteroidetes и Firmicutes при МЗО выражены значительно меньше, чем при МНЗО. Вероятно, эти изменения оказываются не критичными для метаболической функции микробного сообщества в целом, выработки ею регуляторных молекул и метаболитов (индолов, кинуренинов, короткоцепочечных жирных кислот, вторичных желчных кислот, витаминов и незаменимых аминокислот) и компенсируются повышением разнообразия, что, соответственно, обеспечивает сохранение регуляторной оси «микробиота – печень – жировая ткань».

МНЗО характеризуется максимальными проявлениями нарушений углеводного обмена, липотоксичности и дислипидемией. Причем пациенты с МНЗО имели более низкий уровень адипонектина и лептина, чем пациенты с МЗО. При МНЗО было также обнаружено статистически значимое возрастание уровней FGF21. Повышение уровня FGF21 при МНЗО, возможно, является несостоятельным механизмом компенсации гипергликемии, поскольку адипоциты, достигшие критической гипертрофии, инсулинорезистентны и не могут утилизировать глюкозу, в связи с этим возникает необходимость формирования дополнительного пути ее метаболизма с целью устранения гипергликемии, в частности, усиление метаболизма в мышцах активирует процесс утилизации глюкозы мышечной тканью миокином FGF21. Важно отметить, что особенностью фенотипа МНЗО стала утрата связи между уровнем глюкозы и показателями альфа-разнообразия микробиома кишечника, что указывает на потерю регуляторного влияния микробиома кишечника в оси «микробиота кишечника – печень – жировая ткань» и появлению патологических взаимосвязей при данном фенотипе ожирения.

Причины более низкой концентрации адипонектина при МНЗО в сравнении с МЗО, неясны, но они могут быть связаны с хронической гиперинсулинемией при МНЗО, которая подавляет выработку адипонектина в жировой ткани и тем самым генерирует цикл обратной связи сниженной секреции адипонектина, вызванной инсулинорезистентностью [3, 28]. В нашем исследовании уровень лептина у пациентов с МНЗО был значимо выше по сравнению с МЗО, что согласовывалось с данными других авторов [29] и, возможно, связано с нарушением белоксинтетического процесса в гипертрофированных адипоцитах. Однако вклад лептина в патогенезе МНЗО требуется уточнить, поскольку есть исследования, в которых содержание лептина было достоверно выше у пациентов с МНЗО [30], либо различия отсутствовали [31]. Помимо общих значимых корреляционных связей при МНЗО были выявлены характерные для данного фенотипа ожирения, в частности, прямая значимая корреляция между уровнем миостатина и остеокина. В отличие от МЗО при МНЗО показатели альфа-разнообразия микробного сообщества кишечника значимо снижались и утрачивали корреляцию с уровнем глюкозы в крови, а обратные индексы приобретали корреляцию с клиническими и

лабораторными показателями метаболического синдрома и сахарного диабета 2-го типа.

ВЫВОДЫ

Таким образом, при ожирении по сравнению со здоровыми лицами значимо выше ($p < 0,05$) уровни лептина, аспросина, инсулина и ниже — уровень адипонектина. Корреляционный анализ показал дисбаланс в системе регуляции с вовлечением фактора гипоксии и формирование взаимосвязанных изменений в адипогенной, миогенной и остеогенной дифференцировке мезенхимных стволовых

клеток. Массовый корреляционный анализ позволил выявить утрату протективного влияния разнообразия микробиоты на метаболические процессы при МНЗО. Дальнейшее изучение взаимосвязи микробиоты кишечника с жировым обменом и углеводными показателями позволило бы усовершенствовать в будущем стратегию терапии ожирения и ассоциированных с ним метаболических нарушений путем разработки микробиом-ассоциированного лечения ожирения. Помимо этого, на основании полученных данных возможно проведение ранней профилактики развития метаболических нарушений и конверсии МЗО в МНЗО.

Литература

- Frühbeck G, Catalán V, Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J. Adiponectin-leptin ratio: A promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk. *Adipocyte*. 2018; 7 (1): 57–62. DOI: 10.1080/21623945.2017.1402151.
- Iacobini C, Pugliese G, Blasetti Fantauzzi C, et al. Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metabolism*. 2019; 92: 51–60. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.11.009.
- Smith GI, Mittendorfer B, Klein S. Metabolically healthy obesity: facts and fantasies. *J Clin Invest*. 2019; 129 (10): 3978–89. DOI: 10.1172/JCI129186.
- Garvey WT, Garber AJ, Mechanick JL, et al. The AACE Obesity Scientific Committee. American association of clinical endocrinologists and American college of endocrinology position statement on the 2014 advanced framework for a new diagnosis of obesity as a chronic disease. *Endocr Pract*. 2014; 20 (9): 977–89. DOI: 10.4158/EP14280.PS.
- Graf C, Ferrari N. Metabolic Health-The Role of Adipo-Myokines. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (24): 6159. DOI: 10.3390/ijms20246159.
- Bakhal A. Adipokines--targeting a root cause of cardiometabolic risk. *QJM*. 2008; 101 (10): 767–76. DOI: 10.1093/qjmed/hcn066.
- Doumatey AP, Bentley AR, Zhou J, Huang H, Adeyemo A, Rotimi CN. Paradoxical Hyperadiponectinemia is Associated With the Metabolically Healthy Obese (MHO) Phenotype in African Americans. *J Endocrinol Metab*. 2012; 2 (2): 51–65. DOI: 10.4021/jem95W.
- Bluher S. Metabolically healthy obesity from childhood to adulthood — does weight status alone matter? *Metabolism*. 2014; 63: 1084–109.
- Wang HY. Plasma asprosin concentrations are increased in individuals with glucose dysregulation and correlated with insulin resistance and first-phase insulin secretion. *Mediators of Inflammation*. 2018; ID 9471583.
- Amor M, Itariu BK, Moreno-Viedma V, Keindl M, Jürets A, Prager G, et al. Serum Myostatin is Upregulated in Obesity and Correlates with Insulin Resistance in Humans. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019; 127 (8): 550–6.
- Staiger H, Keuper M, Berti L, Hrabe de Angelis M, Häring HU. Fibroblast Growth Factor 21-Metabolic Role in Mice and Men. *Endocr Rev*. 2017; 38 (5): 468–88.
- Hu C, Zhang X, Zhang N, Wei WY, Li LL, Ma ZG, et al. Osteocrin attenuates inflammation, oxidative stress, apoptosis, and cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Clin Transl Med*. 2020; 10 (3): e124.
- Fu J, Li Y, Esangbedo IC, Li G, Feng D, Li L, et al. Circulating Osteonectin and Adipokine Profiles in Relation to Metabolically Healthy Obesity in Chinese Children: Findings From BCAMS. *J Am Heart Assoc*. 2018; 7 (23): e009169. DOI: 10.1161/JAHA.118.009169.
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*. 2019; 7 (1): 14. DOI: 10.3390/microorganisms7010014.
- Стома И. О., Карпов И. А. Микробиом человека. Минск: Доктор Дизайн, 2018; 122 с.
- Bombin A, Yan S, Bombin S, Mosley JD, Ferguson JF. Obesity influences composition of salivary and fecal microbiota and impacts the interactions between bacterial taxa. *Physiological Reports*. 2022; 10: e15254. Available from: <https://doi.org/10.14814/phy2.15254>.
- Aron-Wisniewsky J, Prifti E, Belda E, et al. Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery. *Gut*. 2019; 68 (1): 70–82. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-316103.
- Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Edr Prifti, Nicolas Pons, Emmanuelle Le Chatelier, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*. 2013; 500 (7464): 585–8. DOI: 10.1038/nature12480. Erratum in: *Nature*. 2013; 502 (7472) 580.
- Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110 (22): 9066–71. DOI: 10.1073/pnas.1219451110.
- Меньшиков В. В., редактор. Методики клинических лабораторных исследований. Справочное пособие. Том 3. М.: Лабора, 2009; 880 с.
- Гапонов А. М., Волкова Н. И., Ганенко Л. А., Набока Ю. Л., Маркелова М. И., Синягина М. Н., и др. Особенности микробиома толстой кишки у пациентов с ожирением при его различных фенотипах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98 (2): 144–155. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-66>.
- Колесникова И. М., Гапонов А. М., Ганенко Л. А., Волкова Н. И., Григорьева Т. В., Лайков А. В. и др. Взаимосвязь содержания нейротрофов кишечного микробиома при различных метаболических типах ожирения. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2022; 58 (54): 298–310.
- Yosae S, Khodadost M, Esteghamati A, et al. Adiponectin: An Indicator for Metabolic Syndrome. *Iran J Public Health*. 2019; 48 (6): 1106–15.
- Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2015; 26 (4): 193–200. DOI: 10.1016/j.tem.2015.01.006.
- Izquierdo AG, Crujeiras AB, Casanueva FF, Carreira MC. Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later? *Nutrients*. 2019; 11 (11): 2704. DOI: 10.3390/nu11112704.
- Yuan M, Li W, Zhu Y, et al. Asprosin: A novel player in metabolic diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020; 11: 64. DOI: 10.3389/fendo.2020.00064.
- Ugur K, Aydin S. Saliva and blood asprosin hormone concentration associated with obesity. *Int J Endocrinol*. 2019; 2019: 2521096. DOI: 10.1155/2019/2521096.
- Elisha B, Karelis AD, Imbeault P, et al. Effects of acute hyperinsulinaemia on total and high-molecular-weight adiponectin concentration in metabolically healthy but obese postmenopausal women: a Montreal-Ottawa New Emerging Team (MONET)

- study. *Diabetes Metab.* 2010; 36 (4): 319–21. DOI: 10.1016/j.diabet.2010.03.004.
29. Ung UJ, Choi M-S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2014; 15 (4): 6184–223. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms15046184111,112>.
 30. Jamar G, Caranti DA, de Cassia Cesar H, et al. Leptin as a cardiovascular risk marker in metabolically healthy obese: Hyperleptinemia in metabolically healthy obese. *Appetite.* 2017; 108: 477–82. DOI: 10.1016/j.appet.2016.11.013.
 31. Fu J, Li Y, Esangbedo IC. et al. Circulating osteonectin and adipokine profiles in relation to metabolically healthy obesity in chinese children: findings from BCAMS. *J Am Heart Assoc.* 2018; 7 (23): e009169. DOI: 10.1161/JAHA.118.009169.
- ## References
1. Frühbeck G, Catalán V, Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J. Adiponectin-leptin ratio: A promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk. *Adipocyte.* 2018; 7 (1): 57–62. DOI: 10.1080/21623945.2017.1402151.
 2. Iacobini C, Pugliese G, Blasetti Fantauzzi C, et al. Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metabolism.* 2019; 92: 51–60. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.11.009.
 3. Smith GI, Mittendorfer B, Klein S. Metabolically healthy obesity: facts and fantasies. *J Clin Invest.* 2019; 129 (10): 3978–89. DOI: 10.1172/JCI129186.
 4. Garvey WT, Garber AJ, Mechanick JL, et al. The AACE Obesity Scientific Committee. American association of clinical endocrinologists and American college of endocrinology position statement on the 2014 advanced framework for a new diagnosis of obesity as a chronic disease. *Endocr Pract.* 2014; 20 (9): 977–89. DOI: 10.4158/EP14280.PS.
 5. Graf C, Ferrari N. Metabolic Health-The Role of Adipo-Myokines. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (24): 6159. DOI: 10.3390/ijms20246159.
 6. Bakhai A. Adipokines—targeting a root cause of cardiometabolic risk. *QJM.* 2008; 101 (10): 767–76. DOI: 10.1093/qjmed/hcn066.
 7. Doumatey AP, Bentley AR, Zhou J, Huang H, Adeyemo A, Rotimi CN. Paradoxical Hyperadiponectinemia is Associated With the Metabolically Healthy Obese (MHO) Phenotype in African Americans. *J Endocrinol Metab.* 2012; 2 (2): 51–65. DOI: 10.4021/jem95W.
 8. Bluher S. Metabolically healthy obesity from childhood to adulthood — does weight status alone matter? *Metabolism.* 2014; 63: 1084–109.
 9. Wang HY. Plasma asprosin concentrations are increased in individuals with glucose dysregulation and correlated with insulin resistance and first-phase insulin secretion. *Mediators of Inflammation.* 2018; ID 9471583.
 10. Amor M, Itariu BK, Moreno-Viedma V, Keindl M, Jürets A, Prager G, et al. Serum Myostatin is Upregulated in Obesity and Correlates with Insulin Resistance in Humans. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2019; 127 (8): 550–6.
 11. Staiger H, Keuper M, Berti L, Hrabe de Angelis M, Häring HU. Fibroblast Growth Factor 21-Metabolic Role in Mice and Men. *Endocr Rev.* 2017; 38 (5): 468–88.
 12. Hu C, Zhang X, Zhang N, Wei WY, Li LL, Ma ZG, et al. Osteocrin attenuates inflammation, oxidative stress, apoptosis, and cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Clin Transl Med.* 2020; 10 (3): e124.
 13. Fu J, Li Y, Esangbedo IC, Li G, Feng D, Li L, et al. Circulating Osteonectin and Adipokine Profiles in Relation to Metabolically Healthy Obesity in Chinese Children: Findings From BCAMS. *J Am Heart Assoc.* 2018; 7 (23): e009169. DOI: 10.1161/JAHA.118.009169.
 14. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiaro GAD, Gasbarrini A, et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms.* 2019; 7 (1): 14. DOI: 10.3390/microorganisms7010014.
 15. Stoma IO, Karpov IA. *Mikrobiom cheloveka.* Minsk: Doktor Dizajn, 2018; 122 s. Russian.
 16. Bombin A, Yan S, Bombin S, Mosley JD, Ferguson JF. Obesity influences composition of salivary and fecal microbiota and impacts the interactions between bacterial taxa. *Physiological Reports.* 2022; 10: e15254. Available from: <https://doi.org/10.14814/phy2.15254>.
 17. Aron-Wisniewsky J, Prifti E, Belda E, et al. Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery. *Gut.* 2019; 68 (1): 70–82. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-316103.
 18. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Edi Prifti, Nicolas Pons, Emmanuelle Le Chatelier, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature.* 2013; 500 (7464): 585–8. DOI: 10.1038/nature12480. Erratum in: *Nature.* 2013; 502 (7472) 580.
 19. Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110 (22): 9066–71. DOI: 10.1073/pnas.1219451110.
 20. Menshikov VV, redaktor. *Metodiki klinicheskix laboratornyx issledovanij. Spravochnoe posobie.* Tom 3. M.: Labora, 2009; 880 s. Russian.
 21. Gaponov AM, Volkova NI, Ganenko LA, Naboka YuL, Markelova MI, Sinyagina MN, i dr. Osobennosti mikrobioma tolstoj kishki u pacientov s ozhireniem pri ego razlichnyx fenotipax. *Zhurnal mikrobiologii, ehpidemiologii i immunobiologii.* 2021; 98 (2): 144–155. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-66>. Russian.
 22. Kolesnikova IM, Gaponov AM, Ganenko LA, Volkova NI, Grigoreva TV, Lajkov AV, i dr. Vzaimosvyaz' soderzhaniya nejrotrofov kishhechnogo mikrobioma pri razlichnyx metabolicheskix tipax ozhireniya. *Zhurnal ehvolucionnoj bioximii i fiziologii.* 2022; 58 (54): 298–310. Russian.
 23. Yosae S, Khodadost M, Esteghamati A, et al. Adiponectin: An Indicator for Metabolic Syndrome. *Iran J Public Health.* 2019; 48 (6): 1106–15.
 24. Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2015; 26 (4): 193–200. DOI: 10.1016/j.tem.2015.01.006.
 25. Izquierdo AG, Crujeiras AB, Casanueva FF, Carreira MC. Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later? *Nutrients.* 2019; 11 (11): 2704. DOI: 10.3390/nu11112704.
 26. Yuan M, Li W, Zhu Y, et al. Asprosin: A novel player in metabolic diseases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020; 11: 64. DOI: 10.3389/fendo.2020.00064.
 27. Ugur K, Aydin S. Saliva and blood asprosin hormone concentration associated with obesity. *Int J Endocrinol.* 2019; 2019: 2521096. DOI: 10.1155/2019/2521096.
 28. Elisha B, Karelis AD, Imbeault P, et al. Effects of acute hyperinsulinaemia on total and high-molecular-weight adiponectin concentration in metabolically healthy but obese postmenopausal women: a Montreal-Ottawa New Emerging Team (MONET) study. *Diabetes Metab.* 2010; 36 (4): 319–21. DOI: 10.1016/j.diabet.2010.03.004.
 29. Ung UJ, Choi M-S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2014; 15 (4): 6184–223. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms15046184111,112>.
 30. Jamar G, Caranti DA, de Cassia Cesar H, et al. Leptin as a cardiovascular risk marker in metabolically healthy obese: Hyperleptinemia in metabolically healthy obese. *Appetite.* 2017; 108: 477–82. DOI: 10.1016/j.appet.2016.11.013.
 31. Fu J, Li Y, Esangbedo IC. et al. Circulating osteonectin and adipokine profiles in relation to metabolically healthy obesity in chinese children: findings from BCAMS. *J Am Heart Assoc.* 2018; 7 (23): e009169. DOI: 10.1161/JAHA.118.009169.

ОСНОВНЫЕ МЕРЫ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ПРОМЫШЛЕННОЙ ПОЛИТИКИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Т. Ю. Гайдин^{1,2}, Е. В. Геллер², С. А. Рожнова², Т. А. Гайдина² ✉

¹ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

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

Ввиду изменений в современном мире необходимо развитие отечественной фармацевтической отрасли, что особенно актуально при проведении политики импортозамещения. В работе классифицированы основные меры промышленной политики государства в фармацевтической отрасли: информационно-консультационные, научно-технические, инновационные и экономические. Для каждой группы мер промышленной политики рассмотрены практические действия и их возможные последствия: стимулирование внутреннего потребления, регулирование импорта, стимулирование и поддержка экспорта, стимулирование технологического развития, государственно-частное партнерство, поддержка развития межотраслевых территориально-производственных комплексов (кластеров), прямая государственная поддержка инвестиций, налоговые инвестиционные стимулы.

Ключевые слова: фармацевтическая отрасль, поддержка конкуренции, промышленная политика, инновации, благосостояние потребителя

Вклад авторов: Т. Ю. Гайдин, Е. В. Геллер — анализ литературы, проведение исследования, подготовка рукописи; С. А. Рожнова, Т. А. Гайдина — анализ литературы, планирование и проведение исследования, подготовка рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Тимофей Юрьевич Гайдин
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; gaydin@econ.msu.ru

Статья получена: 30.01.2023 **Статья принята к печати:** 17.02.2023 **Опубликована онлайн:** 28.02.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.007

MAIN STATE INDUSTRIAL POLICY MEASURES FOR THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY OF THE RUSSIAN FEDERATION

Gaydin TY^{1,2}, Geller EV², Rozhnova SA, Gaydina TA² ✉

¹ Department of Competition and Industrial Policy, Faculty of Economics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Due to the changes in the modern world, it is necessary to develop the domestic pharmaceutical industry, which is a task especially important in the context of implementation of the import substitution policy. The article classifies the main measures the state industrial policy has for the pharmaceutical industry; these measures cover informational and consulting aspects, research and technical parts, innovations and economic matters. Practical actions and their possible consequences are considered for each group of the industrial policy measures: encouragement of domestic consumption, regulation of imports, stimulation and support of exports, stimulation of technological development, public-private partnerships, support of the development of intersectoral territorial production complexes (clusters), direct state support of investment activities, tax incentives for investors.

Keywords: pharmaceutical industry, competition support, industrial policy, innovation, consumer welfare.

Author contribution: Gaydin TY, Geller EV — literature analysis, study conduct, manuscript authoring; Rozhnova SA, Gaydina TA — literature analysis, study planning and conduct, manuscript authoring.

✉ **Correspondence should be addressed:** Timofey Yu. Gaydin
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; gaydin@econ.msu.ru

Received: 30.01.2023 **Accepted:** 17.02.2023 **Published online:** 28.02.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.007

Российская фармацевтическая отрасль

Производство лекарственных средств (ЛС) всегда было инвестиционно-привлекательной отраслью российской экономики для фармацевтических компаний, так как российский рынок один из самых крупных и растущих рынков ЛС в мировой экономике. Объем коммерческого рынка ЛС за период июнь 2021 г. — июнь 2022 г. составил около 1,3 триллионов рублей. Объем коммерческого рынка лекарств по итогам первого полугодия 2022 г. относительно аналогичного периода 2021 г. в рублевом эквиваленте вырос на 29,2% [1]. Фармацевтическая отрасль экономики имеет стратегическое значение, поскольку здоровье населения зависит от своевременного обеспечения качественными ЛС и не может быть критически зависимым от импорта. За последние 9 лет в России открыты 62 фармацевтические производственные площадки, запущены 16 заводов, в настоящий момент работают более 500 предприятий фармацевтической промышленности, которые обеспечивают стабильное

производство ЛС в условиях санкций, однако этого недостаточно для развития конкуренции и необходимо проведение промышленной политики, направленной на развитие фармацевтического рынка [2]. В России основными лидирующими игроками остаются зарубежные компании, специализирующиеся не только в области коммерции и продвижения, но и в разработке и производстве фармацевтической продукции: Отисифарм, Bayer, Stada, GlaxoSmithKline, Sanofi [3].

Учитывая существующие на сегодняшний день политические и эпидемиологические условия, а также значительное превосходство зарубежных компаний в фармацевтической отрасли, промышленная политика является важным конструктивным инструментом для российской экономики. Импортозамещение показало себя недостаточно эффективным и затратным в период начальной адаптации [4].

В статье определены меры промышленной политики, включающие информационно-консультационные, научно-технические, инновационные и экономические.

Таблица. Меры промышленной политики и инструменты государственной поддержки. (По данным: Калинин А. Построение сбалансированной промышленной политики: вопросы структурирования целей, задач, инструментов. Вопросы экономики. 2012; (4): 132–146.)

№	Меры промышленной политики	Инструменты государственной поддержки
1	Стимулирование потребления отечественных ЛС	Государственные закупки продукции отечественных предприятий
2	Регулирование импорта ЛС	Нетарифное регулирование импорта, технологические барьеры
3	Стимулирование и поддержка экспорта ЛС	Налоговые льготы по экспортируемой продукции, упрощенные таможенные процедуры
4	Стимулирование технологического развития	Ресурсное обеспечение инновационно-технологического развития
5	Государственно-частное партнерство	Совместные предприятия
6	Поддержка развития межотраслевых территориально-производственных комплексов (кластеров)	Организационная и финансовая поддержка формирования и развития кластеров Организация сотрудничества между образовательными и научными учреждениями, производителями и отраслевыми организациями
7	Прямая государственная поддержка инвестиций	Субсидирование процентной ставки или затрат, снижение требований к депозиту, иные преференции
8	Налоговые инвестиционные стимулы	Льготы

Меры промышленной политики

В настоящее время в России применяют меры промышленной политики, в том числе в фармацевтической отрасли, которые разработаны с учетом сложившихся политических и эпидемиологических обстоятельств (см. таблицу) [5, 6].

Кроме вышеперечисленных мер промышленной политики, необходимо проводить кадровую политику, поскольку в фармацевтической промышленности конкурентоспособные кадровые ресурсы обеспечивают экономическую устойчивость предприятий. Навыки, профессиональная подготовка и квалификация работников способствуют повышению эффективности производства. Спрос на высококвалифицированный персонал давно превысил предложение, ситуация на рынке труда характеризуется значительной нехваткой рабочей силы [7].

Согласно нормативным документам продажа ЛС в иностранной упаковке на территории РФ возможна до 31 декабря 2023 г. при условии наличия русскоязычной маркировки [8]. Кроме того, поставщики ЛС обязаны предупреждать за 6 месяцев об уходе с фармацевтического рынка [9].

Стимулирование внутреннего потребления было проанализировано в одном из исследований по совместным закупкам ЛС в странах с низким и средним уровнем дохода [10]. Авторы изучали структуру фармацевтических рынков в Индии (штат Кер-Ала), Филиппинах, Сенегале, Сербии, Южной Африке (подгруппа штатов Квазулу-Натал, Северо-Западный Кейп и Восточный Кейп), Тунисе и Замбии. База исследуемых данных по закупкам ЛС в период с 2015 по 2017 г. включала 16 терапевтических областей с 40 ЛС, большинство из которых — дженерики. По результатам работы определены две закономерности. Во-первых, повышенный спрос на ЛС, произведенные в регионах с низким и средним уровнем дохода, укрепляет позиции компаний — производителей ЛС как получателей государственных закупок. Во-вторых, централизованные закупки осуществляются в больших объемах, что позволяет правительствам получать скидки на крупные заказы. Таким образом, крупные централизованные закупки фармацевтических препаратов в государственном секторе приводят к снижению цен [10]. Стимулировать внутреннее потребление отечественных препаратов можно, если: население страны имеет доступ ко всем необходимым ЛС; промышленные предприятия имеют

достаточное количество мощностей и человеческих ресурсов; поддержка своих производителей не наносит критического ущерба экономике в целом.

В противном случае для снижения цен необходимо регулировать импорт ЛС. Например, в США закупка рецептурных препаратов составляет 10% от общих расходов на здравоохранение, объем продаж рецептурных препаратов в 2016 г. составил более 448 млрд долларов. Исследование, проведенное фондом семьи Кайзер (Kaiser Family Foundation), показало следующие средние годовые расходы бенефициаров программы Medicare в 2019 г. на ЛС, используемые при различных гематологических злокачественных заболеваниях: венетоклакс — 8712 долларов в год, иматиниб — 8983 доллара в год, акалабрутиниб — 10 175 долларов в год, мидостаурин — 11 830 долларов в год и леналидомид — 14 461 доллар в год. Как потребители, так и политики подчеркнули значительные различия в стоимости ЛС в США и в других промышленно развитых странах. Многие из этих препаратов являются новыми и еще не подвержены ценовому давлению дженериков или биоаналогов. Предложено разрешить дополнительный крупномасштабный импорт ЛС для снижения потребительских цен из следующих стран: Австралия, Канада, Израиль, Япония, Новая Зеландия, Швейцария, Южная Африка, государства-члены ЕС и государства-члены Европейской экономической зоны [11].

В Европе, США и в других странах с сильным патентным законодательством не допускается конкурирующим производителям выпускать непатентованные лекарства или биоаналоги, даже если они предназначены только для экспорта в страну, где соответствующие патенты не действительны, получены или истекли. Такая ситуация стимулирует производителей дженериков систематически расширять свои производственные мощности на потенциальных экспортных рынках, а не в Европе или США в ожидании истечения срока действия патентов. Ожидается, что непродление патентных прав в других странах принесет ряд преимуществ европейскому рынку, включая дополнительный экспорт на сумму около 1 млрд долларов в год и около 25 000 новых рабочих мест [12]. В России правовая защита патентообладателя в области фармацевтической разработки соблюдена на уровне международных норм. Однако патентное право не всегда согласуется с такими факторами, как безопасность государства, охрана жизни и здоровья граждан, общественное благосостояние и развитие технического прогресса. Поэтому государство предусматривает

такие механизмы регулирования этих противоречий, как ограничение патентного права в некоторых случаях — принудительное лицензирование [13].

В последние годы в рамках промышленной политики Евросоюза было создано государственно-частное партнерство Innovative Medicines Initiative (IMI) для активной разработки инновационных ЛС. Задачи IMI — ускорение разработки более эффективных и безопасных ЛС путем создания надежных и проверенных моделей, устранение плохо предсказуемых доклинических моделей, разработка новых биомаркеров и мишеней для лекарств, а также создание инструментов и методов прогнозирования побочных реакций на лекарства. Получив финансирование в размере около 5 млрд евро, IMI может внести свой вклад в разработку новых лекарств в Европе к 2024 г. IMI поддерживает 86 консорциумов, в которые входят 593 исследовательские группы — члены European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA), 1214 академических партнерских групп и 249 других партнерских групп. IMI занимается всеми видами фармацевтических исследований, включая разработку биомаркеров, ЛС для лечения инфекционных заболеваний и заболеваний центральной нервной системы [14].

В России в рамках реализации промышленной политики с 2010 г. начали создаваться фармацевтические кластеры [15]. Одним из основных экспортеров в калужском фармацевтическом кластере является компания Liston, которая поставляет медицинские изделия в 35 стран мира и работает более чем в 50 странах. Калужский кластер сотрудничает с компаниями «Евробιοмед», «Бавария» и MediconValley. Ожидается, что экспортная выручка компаний фармацевтического, биотехнологического и биомедицинского кластера Калужской области удвоится к 2024 г. и составит 160 млн долларов при наличии 11,3 тысячи сотрудников, но реальная внешнеполитическая ситуация может внести коррективы в предполагаемые экспортные показатели из-за сокращения товарооборота с европейскими и американскими компаниями и зарождения новых торговых отношений России и стран Восточного и Юго-Азиатского направлений [16, 17]. Поэтому важно сказать о зарубежном опыте внедрения мер промышленной политики в Китайской Народной Республике (КНР) и Республике Корея. Одними из основных мер в КНР являются кредитование, снижение налогообложения, субсидии и

снижение порога входа на рынок. Промышленная политика может повысить эффективность распределения ресурсов и способствовать промышленному развитию [18]. Южная Корея взяла западную модель развития мер промышленной политики, например, импортные барьеры [19].

В целях стимулирования исследований и разработок новых ЛС правительство РФ будет предоставлять субсидии фармацевтическим предприятиям. Существуют две основные стратегии субсидирования: субсидирование инновационных ресурсов и субсидирование инновационной продукции. Для предприятий субсидии дают возможность получения большей прибыли, а для государства — стимулирование инновационной деятельности предприятий и повышение социального благосостояния [20].

Налоговые инвестиционные стимулы для развития фармацевтической отрасли в России тоже существуют. Например, Правительство Москвы выпустило распоряжение, в котором присвоение статуса промышленного комплекса для фармацевтического производства предоставляет налоговые льготы в виде снижения налога на прибыль с 20 до 16,5%. Данные меры поддержки обеспечивают создание высокооплачиваемых рабочих мест и дальнейшее развитие промышленного производства [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современных сложных экономических и внешнеполитических условиях дополнительный анализ и внедрение мер промышленной политики позволят расширить возможности отечественного фармацевтического производства. Поддержка развития межотраслевых территориально-производственных комплексов (кластеров), стимулирование и поддержка экспорта оказываются наиболее привлекательными мерами промышленной политики для фармацевтических компаний и государства. Создание фармацевтических кластеров привело к развитию сотрудничества с 35 странами и возможному появлению 11,3 тыс. рабочих мест. Экспорт по юго-восточному направлению, КНР, Республика Корея, позволит расширить производственные мощности отечественных фармацевтических компаний. При применении комплексных мер промышленной политики возможно создать лучшие предпосылки для развития социально значимой фармацевтической отрасли.

Литература

1. Данные розничного аудита фармацевтического рынка РФ DSM Group. 2022. [цитировано 2023 Январь 28]. Доступно по ссылке: <https://dsm.ru/docs/analytics/Июнь%202022%20Итог.pdf>.
2. Солодова Р. Аналитика от GxP News. 2022. [цитировано 2022 Декабрь 24]. Доступно по ссылке: <https://gxnews.net/2022/06/farmotrasl-rossii-na-nachalo-2022-goda/>.
3. DSM Group. Фармацевтический рынок России: Декабрь 2022 г. 2022. [цитировано 2023 Январь 28]. Доступно по ссылке: <https://dsm.ru/marketing/free-information/analytic-reports/>.
4. Оборин М. С. Проблемы и перспективы импортозамещения в фармацевтической отрасли. Вестник НГИЭИ. 2021; 5 (120): 101–110. DOI: 10.24412/2227-9407-2021-5-101-110.
5. Kurdin A, Shastitko A. The new industrial policy: a chance for the BRICS countries. BRICS Journal of Economics. 2020; 1 (1): 60–80. DOI: 10.38050/2712-7508-2020-5.
6. Калинин А. Построение сбалансированной промышленной политики: вопросы структурирования целей, задач, инструментов. Вопросы экономики. 2012; (4): 132–146. DOI: 10.32609/0042-8736-2012-4-132-146.
7. Корж Н. В., Шкатова К. В., Супиков В. Н. Современные тенденции развития российского рынка труда. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Общественные науки. 2022; 2 (62): 40–51.
8. Постановление Правительства Российской Федерации от 05.04.2022 № 593 «Об особенностях обращения лекарственных средств для медицинского применения при возникновении дефектуры или риска возникновения дефектуры в связи с введением в отношении Российской Федерации ограничительных мер экономического характера». 2023. [цитировано 2023 Март 02]. Доступно по ссылке: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202204110030?index=0&rangeSize=1>.
9. Федеральный закон №323 от 21.11.2011 «Об основах охраны здоровья граждан в РФ». 2023. [цитировано 2023 Март 02]. Доступно по ссылке: <https://www.zakonrf.info/zakon-o-zdorovye-grazhdan/>.

10. Pooled Procurement of Drugs in Low and Middle Income Countries. [цитировано 2023 Январь 28]. Доступно по ссылке: https://www.tse-fr.eu/sites/default/files/TSE/documents/doc/wp/2019/wp_tse_999.pdf.
11. Scheckel CJ, Vincent Rajkumar S. Drug importation: limitations of current proposals and opportunities for improvement. *Blood Cancer Journal*. 2021; 11 (7): 132. DOI: 10.1038/s41408-021-00522-3.
12. Minssen T, Kesselheim AS, Darrow JJ. An export-only exception to pharmaceutical patents in Europe: should the United States follow suit? *Nat Biotechnol*. 2019; 37 (1): 21–22. DOI: 10.1038/nbt.4324.
13. Гайдин Т. Ю., Рожнова С. А. Принудительное лицензирование в фармации: текущее регулирование и перспективы. *Вестник РГМУ*. 2021; (2): 5–11. DOI: 10.24075/vrgmu.2021.011.
14. Schuhmacher A, Gassmann O, McCracken N, Hinder M. Open innovation and external sources of innovation. An opportunity to fuel the R&D pipeline and enhance decision making? *Journal of Translational Medicine*. 2018; 16 (1): 119. DOI: 10.1186/s12967-018-1499-2.
15. Соколова С. В., Карева Н. Н., Иванов А. С. Фармацевтический рынок: кластерный вектор развития. *Проблемы современной экономики*. 2017; 4 (64): 173–8.
16. Дорожкина Т. В., Пильгун Я. С. Особенности развития

Калужского фармацевтического кластера в условиях внешних вызовов: пандемия коронавируса. *Экономика и бизнес: теория и практика*. 2020; 51 (63): 169–72. DOI: 10.24411/2411-0450-2020-10400.

17. Дорожкина Т. В., Татарченко К. Р., Кузнецова А. А. Нацпроект «Международная кооперация и экспорт»: смещение акцента на региональный уровень. *Вестник образовательного консорциума Среднерусский университет*. Серия: Экономика и управление. 2022; (20): 16–18.
18. Chen J, Xie L. Industrial policy, structural transformation and economic growth: evidence from China. *Front Bus. Res China*. 2019; 13 (18): <https://doi.org/10.1186/s11782-019-0065-y>.
19. Lane N. Manufacturing Revolutions: Industrial Policy and Industrialization in South Korea. 2022. 2023. [цитировано 2023 Март 02]. Доступно по ссылке: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3890311>.
20. Huang Z, Lan Y, Zha X. Research on government subsidy strategies for new drug R&D considering spillover effects. *PloS One*. 2022; 17 (2): e0262655. DOI: 10.1371/journal.pone.0262655.
21. Постановление Правительства Москвы от 11.02.2016 N 38-ПП «О мерах по реализации промышленной и инвестиционной политики в городе Москве». 2023. [цитировано 2023 Март 02]. Доступно по ссылке: <https://www.mos.ru/depr/documents/view/269724220/>.

References

1. Danye roznychnogo audita farmacevricheskogo rynka RF DSM Group. 2022. [citirovano 2023 Yanvar' 28] Dostupno po ssylke: <https://dsm.ru/docs/analytics/lyun'%202022%20Itog.pdf>. Russian.
2. Solodova R. Analitika ot GxP News. 2022. [citirovano 2022 Dekabr' 24]. Dostupno po ssylke: <https://gxpnews.net/2022/06/farmotrasl-rossii-na-nachalo-2022-goda/>. Russian.
3. DSM Group. Farmaceuticheskij ryok Rossii: Dekabr' 2022 g. 2022. [citirovano 2023 Yanvar' 28]. Dostupno po ssylke: <https://dsm.ru/marketing/free-information/analytic-reports/>. Russian.
4. Oborin MS. Problemy i perspektivy importozameshcheniya v farmacevricheskoy otrasli. *Vestnik NGIEhl*. 2021; 5 (120): 101–10. DOI: 10.24412/2227-9407-2021-5-101-110. Russian.
5. Kurdin A, Shastitko A. The new industrial policy: a chance for the BRICS countries. *BRICS Journal of Economics*. 2020; 1 (1): 60–80. DOI: 10.38050/2712-7508-2020-5.
6. Kalinin A. Postroenie sbalansirovannoy promyshlennoy politiki: voprosy strukturirovaniya celej, zadach, instrumentov. *Voprosy ehkonomiki*. 2012; (4): 132–146. DOI: 10.32609/0042-8736-2012-4-132-146. Russian.
7. Korzh NV, Shkatova KV, Supikov V. N. Sovremennye tendencii razvitiya rossijskogo rynka truda. *Izvestiya vysshix uchebnyx zavedenij. Povolzhskij region. Obshhestvennye nauki*. 2022; 2 (62): 40–51. Russian.
8. Postanovlenie Pravitel'stva Rossijskoj Federacii ot 05.04.2022 # 593 «Ob osobennostyax obrashheniya lekarstvennyx sredstv dlya medicinskogo primeneniya pri vozniknovenii defektury ili riska vozniknoveniya defektury v svyazi s vvedeniem v otnoshenii Rossijskoj Federacii ogranichitel'nyx mer ehkonomicheskogo xaraktera». 2023. [citirovano 2023 Mart 02]. Dostupno po ssylke: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202204110030?index=0&rangeSize=1>. Russian.
9. Federal'nyj zakon #323 ot 21.11.2011 «Ob osnovax oxrany zdorov'ya grazhdan v RF». 2023. [citirovano 2023 Mart 02]. Dostupno po ssylke: <https://www.zakonrf.info/zakon-o-zdorovye-grazhdan/>. Russian.
10. Pooled Procurement of Drugs in Low and Middle Income Countries. [citirovano 2023 Yanvar' 28]. Dostupno po ssylke: https://www.tse-fr.eu/sites/default/files/TSE/documents/doc/wp/2019/wp_tse_999.pdf.
11. Scheckel CJ, Vincent Rajkumar S. Drug importation: limitations of current proposals and opportunities for improvement. *Blood Cancer Journal*. 2021; 11 (7): 132. DOI: 10.1038/s41408-021-00522-3.
12. Minssen T, Kesselheim AS, Darrow JJ. An export-only exception to pharmaceutical patents in Europe: should the United States follow suit? *Nat Biotechnol*. 2019; 37 (1): 21–22. DOI: 10.1038/nbt.4324.
13. Gaydin TY, Rozhnova SA. Compulsory licensing in pharmaceutical industry: current state of affairs and prospects. *Bulletin of RSMU*. 2021;(2):5–10. DOI: 10.24075/brsmu.2021.011.
14. Schuhmacher A, Gassmann O, McCracken N, Hinder M. Open innovation and external sources of innovation. An opportunity to fuel the R&D pipeline and enhance decision making?. *Journal of Translational Medicine*. 2018; 16 (1): 119. DOI: 10.1186/s12967-018-1499-2.
15. Sokolova SV, Kareva NN, Ivanov AS. Farmaceuticheskij ryok: klasterijnyj vektor razvitiya. *Problemy sovremennoj ehkonomiki*. 2017; 4 (64): 173–8. Russian.
16. Dorozhkina TV, Pilgun YaS. Osobennosti razvitiya Kaluzhskogo farmacevricheskogo klastera v usloviyax vneshnix vyzovov: pandemiya koronavirusa. *Ehkonomika i biznes: teoriya i praktika*. 2020; 51 (63): 169–72. DOI: 10.24411/2411-0450-2020-10400. Russian.
17. Dorozhkina TV, Tatarchenko KR, Kuznecova AA. Nacproekt «Mezhdunarodnaya kooperaciya i ehksport»: smeshhenie akcenta na regional'nyj uroven'. *Vestnik obrazovatel'nogo konsorciuma Srednerusskij universitet*. Seriya: Ehkonomika i upravlenie. 2022; (20): 16–18. Russian.
18. Chen J, Xie L. Industrial policy, structural transformation and economic growth: evidence from China. *Front Bus. Res China*. 2019; 13 (18): <https://doi.org/10.1186/s11782-019-0065-y>.
19. Lane N. Manufacturing Revolutions: Industrial Policy and Industrialization in South Korea. 2022. 2023. [citirovano 2023 Mart 02]. Dostupno po ssylke: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3890311>.
20. Huang Z, Lan Y, Zha X. Research on government subsidy strategies for new drug R&D considering spillover effects. *PloS One*. 2022; 17 (2): e0262655. DOI: 10.1371/journal.pone.0262655.
21. Postanovlenie Pravitel'stva Moskvy ot 11.02.2016 N 38-PP «O merax po realizacii promyshlennoj i investicionnoj politiki v gorode Moskve». 2023. [citirovano 2023 Mart 02]. Dostupno po ssylke: <https://www.mos.ru/depr/documents/view/269724220/>. Russian.

СРЕДНЕСРОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ТЯЖЕЛОЙ ДЕФОРМАЦИИ ПЕРЕДНЕГО ОТДЕЛА СТОПЫ У ПАЦИЕНТОВ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА

К. А. Егизарян, А. П. Ратьев, Е. А. Мирошникова, Е. А. Жаворонков, А. С. Абиленец ✉

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

Комплексные тяжелые деформации переднего отдела стопы у пожилых пациентов, не страдающих ревматоидным артритом, характеризуются выраженным снижением качества жизни, формированием хронического болевого синдрома, снижением общей мобильности с невозможностью подбора обуви для ежедневного использования, усугублением течения сопутствующих соматических заболеваний. Использование классических, сохраняющих сустав техник у данных пациентов зачастую приводит к рецидиву деформации, стойкому сохранению болевого синдрома, необходимости ревизионных вмешательств, часто невозможных из-за усугубления общесоматического или местного статуса пациента. Целью исследования было улучшить результаты хирургического лечения пациентов пожилого возраста, не страдающих ревматоидным артритом, с тяжелой деформацией переднего отдела стопы. Проведено проспективное когортное исследование с выделением ретроспективной группы сравнения результатов оперативного лечения 65 пациентов, с 2016 по 2019 г. Результаты до и после операции оценивали по шкалам FFI, AOFAS Hallux, AOFAS Lesser Toes. Оценку результатов в послеоперационном периоде проводили по шкале Maryland. В исследовании получены статистически значимые различия результатов лечения по шкалам AOFAS Hallux ($p = 0,0001$), AOFAS Lesser Toes ($p = 0,0001$), FFI ($p = 0,0001$), Maryland ($p = 0,0001$). В связи со специфичностью пожилых пациентов радикальные методики, не сохраняющие сустав, могут быть рассмотрены как эффективный предсказуемый способ коррекции, направленный на сокращение ревизионных вмешательств, и являются одноэтапным методом улучшения качества жизни пожилых пациентов.

Ключевые слова: плоско-вальгусная деформация, метатарзалгия, передний отдел стопы

Вклад авторов: К. А. Егизарян — постановка проблематики лечения данных пациентов, редактирование статьи; А. П. Ратьев — концепция исследования, работа с литературой, интерпретация результатов лечения; Е. А. Мирошникова — разработка концепции исследования, теоретическое обоснование лечения пациентов, оперативное лечение и наблюдение за пациентами, сбор и анализ данных; Е. А. Жаворонков — лечение пациентов, послеоперационное ведение, оценка среднесрочных результатов лечения; А. С. Абиленец — оперативное лечение, наблюдение за пациентами, сбор и анализ данных, оценка среднесрочных результатов лечения, редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России (протокол № 181 от 28 января 2018 г.). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Сергеевич Абиленец
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; abilemets@gmail.com

Статья получена: 02.02.2023 **Статья принята к печати:** 20.02.2023 **Опубликована онлайн:** 28.02.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.008

MIDTERM SEVERE FOREFOOT DEFORMITY TREATMENT OUTCOMES IN ELDERLY PATIENTS

Egizaryan KA, Ratyev AP, Miroshnikova EA, Zhavoronkov EA, Abilemets AS ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Severe complex deformities of the forefoot in elderly patients with no rheumatoid arthritis result in the pronounced decrease in quality of life, chronic pain, reduced mobility, failure to get shoes for everyday use, exacerbation of the concomitant somatic diseases. The use of conventional joint preservation techniques in such patients often leads to the deformity relapse, persistent pain, and the need for revision surgery that is often impossible due to worsening of the patients' general somatic status and local functional status. The study was aimed to improve surgical outcomes in elderly patients with no rheumatoid arthritis who had severe forefoot deformities. The prospective cohort study that involved allocation to the retrospective group for comparison of surgical outcomes in 65 patients was carried out in 2016–2019. The results obtained before and after surgery were assessed using the FFI, AOFAS Hallux, and AOFAS Lesser Toes scores. The Maryland scores were used to assess the outcomes during the postoperative period. The study revealed significant differences in treatment outcomes based on the AOFAS Hallux ($p = 0.0001$), AOFAS Lesser Toes ($p = 0.0001$), FFI ($p = 0.0001$), and Maryland ($p = 0.0001$) scores. In view of the elderly patients' specific nature, the radical surgical techniques that do not ensure joint preservation may be considered as effective and predictable methods of correction aimed at reducing the rate of revision surgeries. These techniques represent a one-step method to improve the quality of life of elderly patients.

Keywords: flat-valgus foot, metatarsalgia, forefoot

Author contribution: Egizaryan KA — statement of the problem of managing the patients, manuscript editing; Ratyev AP — study concept, literature review, interpretation of the treatment outcomes; Miroshnikova EA — developing the study concept, theoretical justification of treatment, surgical treatment and monitoring of patients, data acquisition and analysis; Zhavoronkov EA — treatment of patients, postoperative management, assessment of medium-term treatment outcomes; Abilemets AS — surgical treatment, monitoring of patients, data acquisition and analysis, assessment of midterm treatment outcomes, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (protocol No. 181 of 28 January 2018). All patients submitted the informed consent to study participation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey S. Abilemets
Ostrovityanov, 1, Moscow, 117997, Russia; abilemets@mail.ru

Received: 02.02.2023 **Accepted:** 20.02.2023 **Published online:** 28.02.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.008

Оперативное лечение пожилых пациентов с деформацией переднего отдела стопы является сложной задачей. Наличие статической комплексной деформации, при которой существует деформация двух и более лучей стопы с вальгусной

деформацией первого пальца стопы тяжелой степени тяжести и ригидными деформациями малых лучей стопы, трудно поддается коррекции при использовании общепринятых классических вариантов оперативной коррекции.

В процессе формирования тактики лечения необходимо учитывать не только деформацию стопы и качество костной ткани с особенностями подбора металлофиксаторов [1], но и нейроциркуляторный статус конечности, местный статус мягких тканей, наличие и характер течения хронических сопутствующих патологий, прием различных медикаментозных средств, направленных на их компенсацию, необходимость минимизировать гиподинамию пациента, его социальный статус и способность адекватного выполнения послеоперационных инструкций различной степени сложности [2].

С целью минимизации рисков рецидива деформации, формирования хронического болевого синдрома и необходимости проведения ревизионных вмешательств стоит выбирать более предсказуемые тактики оперативной коррекции.

Несмотря на огромное количество предлагаемых вариантов исправления статических комплексных деформаций переднего отдела стопы тяжелой степени тяжести, до сих пор не существует единого мнения о ведении пациентов пожилого возраста [3]. Существующие на момент тактики лечения зачастую базируются лишь на личном опыте хирурга [4].

Учитывая высокие периоперационные риски, многим пациентам пожилого возраста рекомендована консервативная терапия, однако консервативное лечение пациентов, проходящее без рисков операционной интервенции, не позволяет восстановить двигательную активность пациентов, улучшить качество жизни, а зачастую оно просто невозможно ввиду высокой стоимости ортопедических устройств и их труднодоступности [5]. Кроме того, некоторые авторы отмечают повышенную частоту травматизма пожилых пациентов на фоне изменения стереотипа походки из-за тяжелых деформаций стоп [6], а оперативное лечение несмотря на все риски позволяет вернуть пациентам свободу передвижения и улучшить качество жизни [7].

Несмотря на то что удовлетворительных результатов лечения деформации переднего отдела стопы можно достигнуть в основном при помощи оперативной коррекции, процент неудовлетворительных исходов до сих пор достаточно высок — от 25 до 33% [8]. Он будет в разы выше в группе пожилых пациентов, вследствие чего частота ревизионных вмешательств так же будет расти.

Попытки коррекции тяжелых деформаций в данной группе пациентов с применением классических, сохраняющих сустав манипуляций часто приводят к неудаче, ввиду морфологических особенностей длительно текущей деформации, таких как выраженный рубцово-спаечный процесс в области сесамовидного гамма с невозможностью нормальной коррекции его положения без агрессивного мягкотканного релиза, необходимости выраженной латерализации дистального фрагмента первой плюсневой кости и несостоятельности ее фиксации из-за остеопороза различного генеза и минимального костного контакта после смещения фрагментов, повышенного риска аваскулярного некроза головки первой плюсневой кости на фоне нарушения васкуляризации, развития выраженного дегенеративного артроза 1 ПФС после коррекции из-за недооценки степени изначального повреждения хрящевой и субхондральной ткани [9]. Все это ведет к прогрессирующей деформации первого луча стопы и нарушению фазы опоры и толчка [10], неполной коррекции угла PASA и развитию или рецидиву существовавшей ранее трансферной метатарзалгии [11],

развитию обширных мягкотканых повреждений на фоне нарушения циркуляции из-за массивных релизов [12], симптоматических псевдоартрозов [13]. Ригидные вывихи основных фаланг малых пальцев стопы с формированием контрактур и укорочением сосудисто-нервных пучков пальцев повышают риски некротизации тканей и формирования гангрены пальцев, после устранения вывиха с недостаточным укорочением луча [14]. Дегенеративные повреждения фиксирующих мягкотканых структур, таких как подошвенная пластина и коллатеральные связки плюснефаланговых суставов, увеличивают интраоперационное время и мягкотканую травму в попытках восстановления данных структур при помощи пластики или шва, а выполненные остеотомии плюсневых костей малых лучей зачастую заканчиваются симптоматическими псевдоартрозами с формированием выраженной метатарзалгии [15].

Вышеуказанные обстоятельства приводят к необходимости при выборе тактики оперативного лечения у данной крайне сложной группы пациентов опираться на более предсказуемые методы хирургической коррекции и методы, позволяющие с большей вероятностью избежать ревизионных вмешательств и избавить пациента от жалоб в последующем. Одним из таких методов является радикальная, не сохраняющая сустав, операция, изначально предложенная для лечения пациентов, страдающих ревматоидным артритом.

Цель исследования — улучшить результаты хирургического лечения пациентов пожилого возраста, не страдающих ревматоидным артритом и имеющих комплексную деформацию переднего отдела стопы тяжелой степени, с применением не сохраняющей сустав оперативной техники.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Проведено проспективное когортное исследование с выделением ретроспективной группы сравнения результатов оперативного лечения пациентов, пролеченных на клинической базе кафедры травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, в университетской клинике травматологии и ортопедии на базе ГКБ № 1 им. Н. И. Пирогова г. Москвы с 2016 по 2019 г. Средний срок оценки результатов лечения для контрольной группы составил $34,26 \pm 9,48$ месяца, средний срок оценки результатов лечения для пациентов основной группы — $27,73 \pm 6,31$ месяца.

Все пациенты прооперированы одной бригадой хирургов, оперативные вмешательства проводили при спинальной анестезии. Контрольный осмотр пациентов после проведенного оперативного вмешательства проводили члены оперирующей бригады на 6-, 12- и 24-й неделях после оперативного лечения и при последнем обращении пациента. Инструментальное исследование стоп после оперативного лечения, заключающееся в рентгенографии переднего отдела стопы в прямой проекции и проекции $\frac{3}{4}$, так же проводили на 6-, 12- и 24-й неделях и при последнем обращении пациента.

Пациенты

В исследовании участвовали 65 пациентов, из них все были женского пола, что объясняется преимущественным

Таблица 1. Характеристика оперативных вмешательств на 1-м луче стопы

Характеристика методик	Всего пациентов	Число случаев, абс.	Доля случаев, %
Дистальные остеотомии + Akin-остеотомия	35	22	62,90%
Процедура Липидуса + дистальная остеотомия	35	16	45,70%
Резекционная артропластика плюснефалангового сустава	35	5	14,30%

преобладанием симптоматической деформации стопы у женщин. Средний возраст исследуемых пациентов $72,69 \pm 5,54$ года.

Критерии включения в исследование: возраст старше 65 лет; отсутствие установленного диагноза ревматоидного артрита; тяжелая степень деформации первого луча стопы по классификации Coughlin; ригидная молоткообразная деформация одного или более малых пальцев, сопровождающаяся неустраняемым при клиническом осмотре вывихом в плюсне-фаланговом суставе; отсутствием клинического эффекта от консервативной терапии.

Критерии исключения: возраст младше 65 лет; перенесенные ранее корригирующие вмешательства на переднем отделе стопы; легкая или средняя степень деформации первого луча стопы по классификации Coughlin; эластичная деформация малых пальцев.

Во всех группах проводили реконструктивное вмешательство на одной стопе. Пациенты были разделены на две группы в зависимости от применяемой методики.

Контрольная группа пациентов была прооперирована при помощи классических, сохраняющих сустав, методик. В контрольную группу вошли 35 пациентов.

Под классическими методиками нами были приняты следующие оперативные приемы.

Коррекция первого луча стопы в контрольной группе:

- дистальные метадиафизарные остеотомии первой плюсневой кости (SCARF, Chevron, Maestro);
- Akin-остеотомия основной фаланги первого пальца стопы;
- процедура Lapidus;
- резекционная артропластика плюснефалангового сустава.

Варианты коррекции производились в сочетании друг с другом (табл. 1).

Коррекцию малых лучей стопы в контрольной группе производили при помощи:

- DMMO (Distal Minimally Invasive Metatarsal Osteotomy);
- Weil-остеотомия без наkostной фиксации по запатентованной нами методике (патент РФ № 2705233);
- Weil-остеотомия с наkostной фиксацией;
- резекционная артропластика проксимальных межфаланговых суставов малых пальцев стопы (табл. 2).

Пациенты основной группы ($n = 30$) были прооперированы при помощи не сохраняющей сустав методики, известной также как операция Клейтона–Хоффмана, которая включает в себя артродез первого плюснефалангового сустава, резекцию головок 2–5-й плюсневой кости, резекционную артропластику проксимальных межфаланговых суставов с транскутанной фиксацией 2–5-го пальцев стопы спицами в каналы плюсневых костей, либо при

помощи запатентованной нами методики (патент РФ № 2742447), которая включает в себя артродез первого плюснефалангового сустава с фиксацией пластиной, резекцию головок 2–4-й плюсневых костей, резекционную артропластику проксимальных межфаланговых суставов 2–4-го пальцев с транскутанной фиксацией 2–4-го пальцев стопы спицами в каналы плюсневых костей, малоинвазивную косую проксимальную диафизарную остеотомию 5-й плюсневой кости без металлофиксации.

Послеоперационное ведение пациентов

На 2-е сутки после операционного вмешательства пациенту накладывали повязку с эластической фиксацией пальцев в положении гиперкоррекции в плюснефаланговых суставах (подошвенное сгибание) в контрольной группе и в заданном при помощи металлофиксаторов положении в основной группе.

На 14-е сутки производили перевязку послеоперационных ран со снятием швов и повторно накладывали повязку в положении гиперкоррекции в плюснефаланговых суставах до 28-го дня с момента операции, после чего повязки снимали в обеих группах. Фиксирующие спицы в основной группе тоже удаляли на 28-й день после вмешательства.

Всем больным была разрешена нагрузка на прооперированную конечность на следующие сутки после вмешательства, с использованием специальной ортопедической обуви. Рекомендации по ношению ортопедической обуви были различны и зависели от типа реконструктивного вмешательства на первой плюсневой кости. После дистальных остеотомий обувь использовали на протяжении 6 недель, после артродеза первого плюснефалангового сустава и процедуры Lapidus — 8 недель.

Методы оценки результатов

Оценивали следующие предоперационные и послеоперационные рентгенологические параметры:

- угол HVA (hallux valgus angle; угол между продольными осями первой плюсневой кости и основной фаланги первого пальца стопы);
- угол IMA (intermetatarsal angle; угол между продольными осями первой и второй плюсневых костей стопы);
- угол PASA (proximal articular set angle; угол наклона суставной поверхности головки первой плюсневой кости по отношению к ее оси).

Функцию стопы до и после операции оценивали по шкалам FFI (Foot Functional Index), AOFAS (American Orthopaedic Foot and Ankle Society Score) Lesser Toes.

Таблица 2. Характеристики основных вмешательств на малых лучах стопы

Характеристика методик	Всего пациентов	Число случаев, абс.	Доля случаев, %
DMMO	35	6	17,10%
Weil-остеотомия без наkostной фиксации	35	17	65,40%
Weil-остеотомия с наkostной фиксацией	35	9	34,60%
Резекционная артропластика	35	26	74,30%

Таблица 3. Сравнение двух групп по результатам оценки рентгенологических критериев и функции стоп по оценочным шкалам до оперативного лечения

Показатель	Группа		Уровень <i>p</i>
	Контрольная группа	Основная группа	
	(<i>n</i> = 35)	(<i>n</i> = 30)	
Шкалы			
AOFAS Hallux, до операции	18,77 ± 11,44	16,03 ± 5,80	0,8312
AOFAS Lesser Toes, до операции	19,63 ± 13,61	18,10 ± 5,86	0,4009
FFI, до операции	68,74 ± 12,93	72,87 ± 12,66	0,2009
Рентгенологические критерии			
HVA до операции	54,26 ± 6,55	55,67 ± 9,13	0,7366
IMA до операции	19,77 ± 1,99	17,93 ± 2,79	0,0055
PASA до операции	33,60 ± 7,61	37,57 ± 7,05	0,0168

AOFAS (American Orthopaedic Foot and Ankle Society Score) Hallux. Результаты в послеоперационном периоде оценивали также по шкале Maryland.

Согласно полученным результатам (табл. 3), группы статистически не различимы по основным критериям оценки до оперативного лечения. Однако стоит отметить, что при проведении статистической обработки выявлена разница в показателях PASA и IMA, что можно объяснить погрешностями в укладке при рентгенологическом исследовании и малой группой исследуемых пациентов.

Статистический анализ

При сопоставлении двух групп по числовым показателям применяли среднее значение и стандартное отклонение в формате «М ± S». Сравнения двух групп по количественным переменным осуществляли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Статистическую достоверность различий групп для бинарных и категориальных переменных определяли с помощью метода χ^2 Пирсона. Анализ зависимых переменных для сравнения двух периодов осуществляли на основе непараметрического метода Уилкоксона. Уровень статистической значимости был зафиксирован на значении 0,05. Статистическая обработка данных выполнена с использованием пакетов прикладных программ Statistica 10 и SAS JMP 11.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основании полученных данных (табл. 4) можно сделать вывод, что все показатели статистически значимо различаются между двумя сравниваемыми группами. Наиболее значимые различия обнаружены для показателя «FFI» в контрольной группе по отношению к основной

(в среднем на 26,0%; $p < 0,0001$); показателя «AOFAS Lesser Toes» в основной группе по отношению к контрольной (в среднем на 33,1%; $p < 0,0001$); показателя «AOFAS Hallux» в основной группе по отношению к контрольной (в среднем на 19,6%; $p < 0,0001$).

Результаты анализа динамики изменения исследуемых критериев до и после оперативного лечения представлены в табл. 5.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что все показатели статистически значимо изменяются. Наиболее значимы изменения показателя «FFI» (в контрольной группе (в среднем на 34,5%; $p < 0,0001$); показателя «AOFAS Lesser Toes» (в контрольной группе) (в среднем на 29,9%; $p < 0,0001$); показателя «AOFAS Hallux» (в контрольной группе) (в среднем на 43,0%; $p < 0,0001$).

В процессе выполнения статистической обработки данных выявлены также факторы риска, наиболее часто приводящие к удовлетворительным и плохим результатам лечения на основании показателей шкал AOFAS Hallux, AOFAS Lesser Toes, FFI для контрольной группы исследования до оперативного лечения.

Удовлетворительными и плохими результатами лечения по шкалам AOFAS Hallux и AOFAS Lesser Toes являлись результаты ниже 75 баллов. По шкале FFI удовлетворительными и плохими считали результаты выше 40%.

Статистическую значимость влияния показателей на бинарную целевую переменную осуществляли с помощью критерия χ^2 Пирсона. Все факторы сортировали по убыванию значимости (статистика χ^2), и, таким образом, были отобраны ключевые показатели развития рисков события «AOFAS Hallux < 75», «AOFAS Lesser Toes < 75», «FFI > 40».

Таблица 4. Сравнение двух групп по результатам оценки рентгенологических критериев и функции стоп по оценочным шкалам после оперативного лечения

Показатель	Группа		Уровень <i>p</i>
	Контрольная группа	Основная группа	
	(<i>n</i> = 35)	(<i>n</i> = 30)	
Шкалы			
AOFAS Hallux, после операции	61,80 ± 13,99	81,40 ± 4,54	< 0,0001
AOFAS Lesser Toes, после операции	49,49 ± 13,76	82,60 ± 3,34	< 0,0001
Maryland MFS	67,49 ± 7,02	88,40 ± 3,45	< 0,0001
FFI, после операции	34,20 ± 12,59	8,20 ± 4,62	< 0,0001
HVA, после операции	26,20 ± 8,32	12,93 ± 5,53	< 0,0001
IMA, после операции	11,20 ± 2,49	12,67 ± 2,35	0,015

Таблица 5. Оценка динамики изменений исследуемых критериев до и после оперативного лечения

Группа	Показатель	M ± S, до	M ± S, после	Динамика	Разница средних (после-до)	Уровень <i>p</i>
Контрольная группа	AOFAS Hallux	18,77 ± 11,44	61,80 ± 13,99	229,22%	43,03	< 0,0001
Контрольная группа	AOFAS Lesser Toes	19,63 ± 13,61	49,49 ± 13,76	152,11%	29,86	< 0,0001
Контрольная группа	FFI	68,74 ± 12,93	34,20 ± 12,59	-50,25%	-34,54	< 0,0001
Контрольная группа	HVA	54,26 ± 6,55	26,20 ± 8,32	-51,71%	-28,06	< 0,0001
Контрольная группа	IMA	19,77 ± 1,99	11,20 ± 2,49	-43,35%	-8,57	< 0,0001
Контрольная группа	PASA	33,60 ± 7,61	21,06 ± 4,93	-37,33%	-12,54	< 0,0001
Основная группа	AOFAS Hallux	16,03 ± 5,80	81,40 ± 4,54	407,69%	65,37	< 0,0001
Основная группа	AOFAS Lesser Toes	18,10 ± 5,86	82,60 ± 3,34	356,35%	64,5	< 0,0001
Основная группа	FFI	72,87 ± 12,66	8,20 ± 4,62	-88,75%	-64,67	< 0,0001
Основная группа	HVA	55,67 ± 9,13	12,93 ± 5,53	-76,77%	-42,74	< 0,0001
Основная группа	IMA	17,93 ± 2,79	12,67 ± 2,35	-29,37%	-5,26	< 0,0001

Для всех исследуемых групп достоверным фактором риска оказался возраст старше 70 лет.

Для AOFAS Lesser Toes $p = 0,0005$

Для AOFAS Hallux $p = 0,03$

Для FFI $p = 0,002$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В мировой литературе описано огромное число вариантов хирургической коррекции тяжелой вальгусной деформации переднего отдела стопы и различные комбинации методик, однако при выборе вариантов коррекции не учтены возраст пациента, циркуляторный статус конечности, реабилитационный потенциал пациента и его сопутствующие заболевания. Декомпенсация сопутствующих патологий зачастую не позволяет провести ревизионное вмешательство, что приводит к сохранению стойкого болевого синдрома, снижению ежедневной активности пожилого пациента, снижению качества жизни и необходимости постоянного приема противовоспалительных препаратов. Основной задачей хирургического лечения тяжелой деформации у пожилых пациентов является ликвидация болевого синдрома и профилактика рецидива деформации стопы. Так, было показано, что косметический результат не так важен как ликвидация болевого синдрома и возможность увеличить проходимое расстояние [16]. Для данной группы пациентов необходимо выбирать более управляемые, прогнозируемые и надежные методы хирургической коррекции с ликвидацией болевого синдрома. Для тяжелых деформаций переднего отдела стопы у пациентов, страдающих ревматоидным артритом одним из вариантов выбора является артродез плюснефалангового сустава и резекция головок малых плюсневых костей. Путем данной операции, не сберегающей сустав, добиваются стойкой ликвидации болевого синдрома, радикальной коррекции деформации, увеличения ежедневной активности пациента.

Однако в немногочисленных источниках выявлено предположение, что такой тип оперативного лечения подойдет также для коррекции тяжелой ригидной деформации переднего отдела стопы у пожилых пациентов.

Так, при обследовании 13 пациентов (15 стоп; средний срок обследования — 44,3 месяца после операции; диапазон: 20–76 месяцев) средний балл послеоперационной удовлетворенности составил 9,0

(из 10) [17]. Ни одному пациенту в этом наблюдении не потребовалась повторная операция. Оценка боли значительно снизилась с 6,2 до операции до 1,9 после операции ($p < 0,001$). Рентгенологические параметры (1,2 IMA, HVA) улучшились после операции ($p < 0,05$), и на всех 15 стопах достигнуто сращение первого артродеза МТР.

В ретроспективном исследовании 39 пациентов (56 стоп) страдающих тяжелой не ревматоидной деформацией переднего отдела стопы, из которых 13 пациентам (20 стоп) были выполнены артродез первого плюснефалангового сустава и резекции головок малых плюсневых костей, 20 пациентам (26 стоп) были выполнены артродез первого плюснефалангового сустава и Weil-остеотомии плюсневых костей [18]. Средний срок наблюдения составил 24 месяца. Критерии послеоперационного состояния пациентов оценивали при помощи шкал AOFAS и SF-36. Уровень послеоперационной удовлетворенности составил 92% при артродезе 1 ПФС и резекции головок малых плюсневых костей и 91% при артродезе 1 ПФС и остеотомии малых плюсневых костей. Однако оценку количества ревизионных вмешательств в исследуемых группах не проводили. По шкале SF-36 общий балл составил 80,7 балла и 76 баллов соответственно. Исследователи сделали вывод, что данный тип оперативного лечения может быть рекомендован для лечения хронического болевого синдрома при тяжелой неревматоидной деформации переднего отдела стопы.

В ретроспективном исследовании 193 пациентов, из которых 85 относились к старшей возрастной группе, все пациенты были обследованы через 6 месяцев и через 2 года после проведенного вмешательства [19]. Всем им были выполнены классические хирургические приемы по коррекции деформации, в том числе остеотомия SCARF первой плюсневой кости, Akin-остеотомия фаланги первого пальца стопы, Weil-остеотомия малых плюсневых костей. Статистически значимых различий удовлетворенностью результатами лечения по шкалам AOFAS и Sf-36 между когортой молодых пациентов, пациентов среднего возраста и пожилых пациентов выявлено не было, однако стоит отметить что койко-день, проведенный в стационаре в группе пожилых пациентов был выше, чем в остальных группах, повторные обращения за медицинской помощью по поводу болей в оперированной стопе были чаще в группе пожилых пациентов, как и количество повторных госпитализаций, и что самое важное риск рецидива деформаций был выше в 5 раз в группе пожилых пациентов.

В основной группе нашего исследования участвовало 30 пациентов, все пациенты были прооперированы по предложенной методике либо запатентованной нами методике (патент РФ № 2742447).

Результаты лечения оценены по шкалам AOFAS Lesser Toes, AOFAS Hallux, FFI, Maryland, средний срок наблюдения за пациентами составил $27,73 \pm 6,31$ месяцев. В обследуемой группе удалось добиться значительного прироста среднего балла по шкале AOFAS Hallux с $16,03 \pm 5,80$ баллов до $81,40 \pm 4,54$ баллов; средний прирост показателя составил 65,37 баллов; по шкале AOFAS Lesser Toes — с $18,10 \pm 5,86$ до $82,60 \pm 3,34$ баллов, средний прирост показателя составил 64,5 балла; по шкале FFI удалось добиться улучшения функции стопы с $72,87 \pm 12,66\%$ до $8,20 \pm 4,62\%$ в средних значениях, улучшение составило 64,67% в средних показателях. При оценке функции стопы после оперативного лечения по шкале Maryland средний балл составил $88,40 \pm 3,45$ баллов, что соответствует хорошим результатам. В сравнении с контрольной группой удалось добиться статистически значимых различий в результатах лечения по шкалам AOFAS Lesser Toes, AOFAS Hallux, FFI, Maryland. Никому из обследованных пациентов не потребовалось повторных ревизионных вмешательств, связанных с рецидивом метатарзалгии или возникновением трансферной метатарзалгии, с рецидивом вальгусной деформации первого пальца стопы, ригидной молоткообразной деформации пальцев, несращения остеотомий или артродезов.

Описанные результаты лечения, уровень удовлетворенности пациентов, отсутствие необходимости в проведении ревизионных вмешательств достигнуты за счет рационального подбора вида оперативной коррекции статической комплексной тяжелой деформации переднего отдела стопы у столь сложной группы пожилых пациентов. Все прооперированные пациенты оставались мобильными на весь срок послеоперационного периода, что крайне важно для пожилых людей. После проведенных оперативных вмешательств у всех пациентов увеличились уровень ежедневной активности, максимальный километраж проходимого расстояния без боли; пациенты не сталкивались с трудностью в подборе обуви для ежедневного ношения, исчезла необходимость подбора и покупки ортопедической обуви высокой степени сложности.

ВЫВОДЫ

Предложенный вариант оперативной коррекции сложной статической деформации переднего отдела стопы у пожилых пациентов может быть использован в клинической практике. Несмотря на свою радикальность, он позволил добиться стойкого купирования болевого синдрома, снизить риск повторных оперативных вмешательств, восстановить мобильность пожилых пациентов, не страдающих ревматоидным артритом.

Литература

1. Бобров Д. С., Слияков Л. Ю., Ченский А. Д., Матвиенко М. И., Хлодаев М. Ю., Хурцилава Н. Д.. Ригидный 1-й палец стопы: клиника, диагностика и лечение (аналитический обзор литературы). Кафедра травматологии и ортопедии. 2014; 3 (11): 4–12.
2. Егизарян К. А., Мирошникова Е. А., Жаворонков Е. А., Ратьев А. П., Абилец А. С. Анализ результатов оперативного лечения сложных комплексных деформаций переднего отдела стопы у пациентов старшей возрастной группы. Политравма. 2021; 3: 46–53.
3. Deenik A, Verburg A, Willem Louwerens J, de Waal Malefijt M, de Bie R. Evidence of Treatment Algorithms for Hallux Valgus. JSM Foot Ankle 1(1): 1003 (2016)
4. Robinson AHN, Limbers JP. Modern concepts in the treatment of hallux valgus. J Bone Joint Surg. 2005; 87 (8): 1038–45.
5. Mansur H, Cardoso V, Nogueira T, Castro I. Relationship between quality of life and radiological parameters after hallux valgus correction. Acta Ortopedica Brasileira. 2020; 28 (2): 65–68.
6. Muchna A, Najafi B, Wendel CS, Schwenk M, Armstrong DG, Mohler J. Foot problems in older adults associations with incident falls, frailty syndrome, and sensor-derived gait, balance, and physical activity measures. J Am Podiatr Med Assoc. 2018; 108 (2): 126–139. DOI: 10.7547/15-186.
7. S/O K S RZE, Lee M, Chen J, Meng NYE. Do patients aged 70 years and older benefit from hallux valgus surgery? J Foot Ankle Surg. 2022; 61 (2): 310–13. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2021.08.009>.
8. Fleischer AE, Yorath MC, Joseph RM, Baron A, Nordquist T, Moore BJ, et al. Impact of podiatry resident experience level in hallux valgus surgery on postoperative outcomes. J Surg Research. 2014; 189 (2): 262–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.03.005>.
9. Bock P, Kristen KH, Kröner A, Engel A. Hallux valgus and cartilage degeneration in the first metatarsophalangeal joint. The Journal of bone and joint surgery. British volume. 2004; 86 (5): 669–73. Available from: <https://doi.org/10.1302/0301-620x.86b5.14766>.
10. Coetzee JC. Scarf osteotomy for hallux valgus repair: the dark side. Foot & Ankle international. 2003; 24 (1): 29–33. Available from: <https://doi.org/10.1177/107110070302400104>.
11. Maceira E, Monteagudo M. Transfer metatarsalgia post hallux valgus surgery. Foot and ankle clinics. 2014; 19 (2): 285–307. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fcl.2014.03.001>.
12. Solan MC, Davies MS. Revision surgery of the lesser toes. Foot and Ankle Clinics. 2011; 16 (4): 621–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fcl.2011.09.002>.
13. Herzog JL, Goforth WD, Stone PA, Paden MH. A modified fixation technique for a decompressional shortening osteotomy: a retrospective analysis. The Journal of Foot and Ankle Surgery. 2014; 53 (2): 131–6. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2013.12.018>.
14. Solan MC, Davies MS. Revision surgery of the lesser toes. Foot and Ankle Clinics. 2011; 16 (4): 621–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fcl.2011.09.002>.
15. Herzog JL, Goforth WD, Stone PA, Paden MH. A modified fixation technique for a decompressional shortening osteotomy: a retrospective analysis. The Journal of Foot and Ankle surgery. 2014; 53 (2): 131–6. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2013.12.018>.
16. Schneider W, Knahr K. Surgery for hallux valgus. The expectations of patients and surgeons. International Orthopaedics. 2001; 25 (6): 382–5. Available from: <https://doi.org/10.1007/s002640100289>.
17. Nixon DC, McKean RM, Klein SE, Johnson JE, McCormick JJ. Rheumatoid Forefoot Reconstruction in the Nonrheumatoid Patient. Foot & Ankle International. 2017; 38 (6): 605–11. Available from: <https://doi.org/10.1177/1071100717696253>.
18. Giunta JC, Mouton T, Fessy MH, Besse JL. Rheumatoid forefoot reconstruction in nonrheumatic patients: lesser metatarsal head resection versus osteotomy. The Journal Foot and Ankle Surgeons. 2021; 60 (2): 252–7. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2020.03.004>.
19. Goh GS, Tay AYW, Thever Y, Koo, K. Effect of age on clinical and radiological outcomes of hallux valgus surgery. Foot & Ankle International. 2021; 42 (6): 798–804. Available from: <https://doi.org/10.1177/1071100720982975>.

References

- Bobrov DS, Slinyakov Lyu, Chenskiy AD, Matvienko MI, Xlodaev MYu, Xurcilava ND. Rigidnyj 1-j palec stopy: klinika, diagnostika i lechenie (analiticheskij obzor literatury). Kafedra travmatologii i ortopedii. 2014; 3 (11): 4–12. Russian.
- Egiazaryan KA, Miroshnikova EA, Zhavoronkov EA, Ratev AP, Abilemec AS. Analiz rezul'tatov operativnogo lecheniya slozhnyx kompleksnyx deformacij perednego otdela stopy u pacientov starshej vozrastnoj gruppy. Politravma. 2021; 3: 46–53. Russian.
- Deenik A, Verburg A, Willem Louwerens J, de Waal Malefijt M, de Bie R. Evidence of Treatment Algorithms for Hallux Valgus. JSM Foot Ankle 1(1): 1003 (2016)
- Robinson AHN, Limbers JP. Modern concepts in the treatment of hallux valgus. J Bone Joint Surg. 2005; 87 (8): 1038–45.
- Mansur H, Cardoso V, Nogueira T, Castro I. Relationship between quality of life and radiological parameters after hallux valgus correction. Acta Ortopedica Brasileira. 2020; 28 (2): 65–68.
- Muchna A, Najafi B, Wendel CS, Schwenk M, Armstrong DG, Mohler J. Foot problems in older adults associations with incident falls, frailty syndrome, and sensor-derived gait, balance, and physical activity measures. J Am Podiatr Med Assoc. 2018; 108 (2): 126–139. DOI: 10.7547/15-186.
- S/O K S RZE, Lee M, Chen J, Meng NYE. Do patients aged 70 years and older benefit from hallux valgus surgery? J Foot Ankle Surg. 2022; 61 (2): 310–13. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2021.08.009>.
- Fleischer AE, Yorath MC, Joseph RM, Baron A, Nordquist T, Moore BJ, et al. Impact of podiatry resident experience level in hallux valgus surgery on postoperative outcomes. J Surg Research. 2014; 189 (2): 262–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.03.005>.
- Bock P, Kristen KH, Kröner A, Engel A. Hallux valgus and cartilage degeneration in the first metatarsophalangeal joint. The Journal of bone and joint surgery. British volume. 2004; 86 (5): 669–73. Available from: <https://doi.org/10.1302/0301-620x.86b5.14766>.
- Coetzee JC. Scarf osteotomy for hallux valgus repair: the dark side. Foot & Ankle international. 2003; 24 (1): 29–33. Available from: <https://doi.org/10.1177/107110070302400104>.
- Maceira E, Monteagudo M. Transfer metatarsalgia post hallux valgus surgery. Foot and ankle clinics. 2014; 19 (2): 285–307. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fcl.2014.03.001>.
- Solan MC, Davies MS. Revision surgery of the lesser toes. Foot and Ankle Clinics. 2011; 16 (4): 621–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fcl.2011.09.002>.
- Herzog JL, Goforth WD, Stone PA, Paden MH. A modified fixation technique for a decompressional shortening osteotomy: a retrospective analysis. The Journal of Foot and Ankle Surgery. 2014; 53 (2): 131–6. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2013.12.018>.
- Solan MC, Davies MS. Revision surgery of the lesser toes. Foot and Ankle Clinics. 2011; 16 (4): 621–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fcl.2011.09.002>.
- Herzog JL, Goforth WD, Stone PA, Paden MH. A modified fixation technique for a decompressional shortening osteotomy: a retrospective analysis. The Journal of Foot and Ankle surgery. 2014; 53 (2): 131–6. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2013.12.018>.
- Schneider W, Knahr K. Surgery for hallux valgus. The expectations of patients and surgeons. International Orthopaedics. 2001; 25 (6): 382–5. Available from: <https://doi.org/10.1007/s002640100289>.
- Nixon DC, McKean RM, Klein SE, Johnson JE, McCormick JJ. Rheumatoid Forefoot Reconstruction in the Nonrheumatoid Patient. Foot & Ankle International. 2017; 38 (6): 605–11. Available from: <https://doi.org/10.1177/1071100717696253>.
- Giunta JC, Mouton T, Fessy MH, Besse JL. Rheumatoid forefoot reconstruction in nonrheumatic patients: lesser metatarsal head resection versus osteotomy. The Journal Foot and Ankle Surgeons. 2021; 60 (2): 252–7. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2020.03.004>.
- Goh GS, Tay AYW, Thever Y, Koo, K. Effect of age on clinical and radiological outcomes of hallux valgus surgery. Foot & Ankle International. 2021; 42 (6): 798–804. Available from: <https://doi.org/10.1177/1071100720982975>.