

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

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

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

**ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ** [editor@vestnikrgmu.ru](mailto:editor@vestnikrgmu.ru)

**СОТРУДНИЧЕСТВО** [manager@vestnikrgmu.ru](mailto:manager@vestnikrgmu.ru)

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

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2022: 0,6

Журнал включен в WoS. JCR 2021: 0,5

Индекс Хирша (h<sup>2</sup>) журнала по оценке Google Scholar: 8

Scopus<sup>®</sup>

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.2023-06

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

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

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International [www.creativecommons.org](http://www.creativecommons.org)



Подписано в печать 31.12.2023

Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula  
[www.print-formula.ru](http://www.print-formula.ru)

# BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

## BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

**EDITOR-IN-CHIEF** Denis Rebrikov, DSc, professor

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

**EDITORS** Valentina Geidebrekht, PhD; Nadezda Tikhomirova

**TECHNICAL EDITOR** Evgeny Lukyanov

**TRANSLATORS** Nadezda Tikhomirova, Vyacheslav Vityuk

**DESIGN AND LAYOUT** Marina Doronina

### EDITORIAL BOARD

**Averin VI**, DSc, professor (Minsk, Belarus)

**Alipov NN**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Belousov VV**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

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

**Bylova NA**, CSc, docent (Moscow, Russia)

**Gainetdinov RR**, CSc (Saint-Petersburg, Russia)

**Gendlin GYe**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

**Gorbacheva LR**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Gordeev IG**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Gudkov AV**, PhD, DSc (Buffalo, USA)

**Gulyaeva NV**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

**Danilenko VN**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Zarubina TV**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

**Kagan VE**, professor (Pittsburgh, USA)

**Kzyshkowska YuG**, DSc, professor (Heidelberg, Germany)

**Kobrinskii BA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Kozlov AV**, MD PhD, (Vienna, Austria)

**Kotelevtsev YuV**, CSc (Moscow, Russia)

**Lebedev MA**, PhD (Darem, USA)

**Manturova NE**, DSc (Moscow, Russia)

**Milushkina OYu**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Mitupov ZB**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Moshkovskii SA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

**Negrebetsky VV**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Novikov AA**, DSc (Moscow, Russia)

**Pivovarov YuP**, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

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

**Razumovskii AYU**, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Rebrova OYu**, DSc (Moscow, Russia)

**Rudoy AS**, DSc, professor (Minsk, Belarus)

**Rylova AK**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

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

**Skoblina NA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Slavyanskaya TA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Smirnov VM**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Spallone A**, DSc, professor (Rome, Italy)

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

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

**Suchkov SV**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Takhchidi KhP**, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

**Favorova OO**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

**Khazipov RN**, DSc (Marsel, France)

**Chundukova MA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

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

**Yakubovskaya RI**, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

**CORRESPONDENCE** [editor@vestnikrgmu.ru](mailto:editor@vestnikrgmu.ru)

**COLLABORATION** [manager@vestnikrgmu.ru](mailto:manager@vestnikrgmu.ru)

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2022: 0.6

**Scopus**<sup>®</sup>

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0.14

**SJR**  
Scimago Journal & Country Rank

Indexed in WoS. JCR 2021: 0.5

**WEB OF SCIENCE**<sup>™</sup>

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.2023-06

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

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

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License [www.creativecommons.org](http://www.creativecommons.org)



Approved for print 31.12.2023

Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula  
[www.print-formula.ru](http://www.print-formula.ru)

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

5

**Взаимосвязь уровней провоспалительных цитокинов с составом бактериальной ДНК крови у детей с ожирением**

С. А. Румянцев, И. В. Кирилина, А. М. Гапонов, Д. Р. Хуснутдинова, Т. В. Григорьева, Е. Д. Теплякова, В. В. Макаров, С. М. Юдин, А. В. Шестопалов

**Relationship between pro-inflammatory cytokine levels and blood bacterial DNA composition in obese children**

Roumiantsev SA, Kirilina IV, Gaponov AM, Khusnutdinova DR, Grigoryeva TV, Teplyakova ED, Makarov VV, Yudin SM, Shestopalov AV

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

14

**Изменения циркадианных ритмов уровней цитокинов в крови пациентов с эссенциальной гипертензией в постковидном периоде**

О. А. Радаева, А. С. Симбирцев, Ю. А. Костина, М. С. Искандярова, Е. В. Негоднова, С. В. Машнина, В. В. Еремеев, К. А. Красноглазова, И. О. Бабушкин

**Altered circadian expression of cytokines in blood of patients with essential hypertension following COVID-19**

Radaeva OA, Simbirtsev AS, Kostina YuA, Iskandyarova MS, Negodnova EV, Mashnina SV, Ereemeev VV, Krasnoglazova KA, Babushkin IO

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

21

**Сравнительный биоинформатический анализ состава генов антимикробной устойчивости в геномах представителей рода *Corynebacterium***

Т. А. Кульшань, И. О. Бугаева, Е. Ф. Соболева, М. С. Аллянова, Д. А. Попов, И. Г. Швиденко

**Comparative bioinformatics analysis of antimicrobial resistance gene pool in the genomes of representatives of genus *Corynebacterium***

Kulshan TA, Bugaeva IO, Soboleva EF, Allyanova MS, Popov DA, Shvidenko IG

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

28

**Влияние нетранслируемых последовательностей мРНК на иммуногенность мРНК-вакцин против *M. tuberculosis* у мышей**

Г. С. Шепелькова, В. В. Решетников, В. Г. Авдиенко, Д. В. Шевырев, В. В. Еремеев, Р. А. Иванов

**Impact of untranslated mRNA sequences on immunogenicity of mRNA vaccines against *M. tuberculosis* in mice**

Shepelkova GS, Reshetnikov VV, Avdienko VG, Sheverev DV, Yeremeev VV, Ivanov RA

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

36

**Получение рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз в *E. coli* для использования в синтезе мРНК *in vitro***

М. В. Захарова, А. А. Загоскин, Р. А. Иванов, М. О. Нагорных

**Preparation of a recombinant ribonuclease inhibitor in *E. coli* for use in mRNA synthesis *in vitro***

Zakharova MV, Zagoskin AA, Ivanov RA, Nagornyykh MO

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

45

**Создание генетически кодируемого светоиндуцируемого сенсора для визуализации ядрышка**

П. А. Журлова, З. В. Беседовская, Е. Л. Соколинская, Л. В. Путляева

**Genetically encoded light-inducible sensor for nucleolar visualization**

Zhurlova PA, Besedovskaya ZV, Sokolinskaya EL, Putlyayeva LV

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

50

**Длинная некодирующая РНК NEAT1\_1 снижает выживаемость первичных нейронных клеток при ЭПР-стрессе**

Н. Е. Пукаева, В. Н. Залевская, А. В. Дейкин, М. И. Таубинская, О. А. Кухарская, Р. К. Овчинников, А. И. Антохин, М. С. Кухарский

**NEAT1\_1 long non-coding RNA reduces the survival of primary neuronal cells under ER-stress**

Pukaeva NE, Zalevskaya VN, Deykin AV, Taubinskaya MI, Kukharskaya OA, Ovchinnikov RK, Antohin AI, Kukharsky MS

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

60

**Частотно-зависимый эффект транскраниальной стимуляции тета-вспышками префронтальной коры на когнитивные функции**

Н. А. Супонева, И. С. Бакулин, А. Г. Пойдашева, Д. О. Синицын, А. Х. Забирова, Д. Ю. Лагода, М. А. Пирадов

**Prefrontal cortex transcranial theta-burst stimulation frequency-dependent effects on cognitive functions**

Suponeva NA, Bakulin IS, Poydasheva AG, Sinitsyn DO, Zabirowa AH, Lagoda DYU, Piradov MA

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

69

**Прогнозирование исходов программ экстракорпорального оплодотворения с использованием модели машинного обучения «Случайный лес»**

Г. М. Владимирский, М. А. Журавлева, А. Э. Дашиева, И. Е. Корнеева, Т. А. Назаренко

**Predicting the outcomes of *in vitro* fertilization programs using a random forest machine learning model**

Vladimirsky GM, Zhuravleva MA, Dashiya AE, Korneeva IE, Nazarenko TA

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

76

**Исследование теплового воздействия фемтосекундных лазерных импульсов на эмбрионы мыши в рамках процедуры вспомогательного хетчинга**

М. В. Кубекина, М. А. Филатов, Ю. Ю. Силаева, Д. С. Ситников

**Exploration of the femtosecond laser pulse thermal effects on the mouse embryos during the assisted hatching procedure**

Kubekina MV, Filatov MA, Silaeva YuYu, Sitnikov DS

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

85

**Возможности использования профилирования экспрессии мРНК для прогноза прогрессирования локальных стадий колоректального рака**

С. В. Гончаров, В. К. Боженко, М. В. Захаренко, А. А. Чаптыков, Т. М. Кулинич, В. А. Солодкий

**The possibility of evaluation mRNA expression profiling to predict progression of local stage colorectal cancer**

Goncharov SV, Bozhenko VK, Zakharenko MV, Chaptikov AA, Kulnich TM, Solodkiy VA

**КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ**

92

**Комбинированные методы лечения метастатической увеальной меланомы**

К. В. Коломиец, Э. С. Пономарева, Я. Р. Посыпина, И. И. Михайлов, Ч. Б. Манджиев, Е. В. Поветкина, Р. Р. Тугуз, С. М. Булгаков, В. И. Репунова

**Methods for combination treatment of metastatic uveal melanoma**

Kolomiets KV, Ponomareva ES, Pospina YaR, Mihailov II, Mandzhiev CB, Povetkina EV, Tuguz RR, Bulgakov SM, Repunova VI

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

97

**Эффективность устранения костных дефектов челюстей**

Г. В. Порядин, Д. А. Еремин, Н. М. Хелминская, В. И. Кравец, И. В. Житарева, А. В. Посадская, Н. М. Краснов, П. А. Шень, М. А. Гурешидз

**Efficacy of the jawbone defect elimination**

Poryadin GV, Eremin DA, Khelminskaya NM, Kravets VI, Zhitareva IV, Posadskaya AV, Krasnov NM, Shen PA, Gureshidze MA

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

102

**Предоперационное планирование артропластики тазобедренного сустава**

Б. Ш. Минасов, Р. Р. Якупов, А. Р. Билялов, Т. Б. Минасов, М. М. Валеев, Т. Р. Мавлютов, И. Э. Нигамедзянов, В. Н. Акбашев, К. К. Каримов

**Preoperative planning of hip arthroplasty**

Minasov BSh, Yakupov RR, Bilyalov AR, Minasov TB, Valeev MM, Mavlyutov TR, Nigamedzanov IE, Akbashev VN, Karimov KK

**МЕТОД**

108

**Технология микрохирургической реконструкции фовеа при макулярных разрывах**

Х. П. Тахчиди

**Foveal microsurgical reconstruction technique for macular hole**

Takhchidi KP

## ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЕЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ С СОСТАВОМ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК КРОВИ У ДЕТЕЙ С ОЖИРЕНИЕМ

С. А. Румянцев<sup>1,2,3</sup>, И. В. Кирилина<sup>1,2,3</sup>✉, А. М. Гапонов<sup>2</sup>, Д. Р. Хуснутдинова<sup>4</sup>, Т. В. Григорьева<sup>4</sup>, Е. Д. Теплякова<sup>5</sup>, В. В. Макаров<sup>6</sup>, С. М. Юдин<sup>6</sup>, А. В. Шестопалов<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Центр молекулярного здоровья, Москва, Россия

<sup>3</sup> Национальный исследовательский центр эндокринологии, Москва, Россия

<sup>4</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>5</sup> Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

<sup>6</sup> Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Жировая ткань как источник развития хронического низкоинтенсивного воспаления активизирует клетки иммунной системы путем выработки цитокинов и хемокинов. Баланс между про- и противовоспалительными молекулами и их связь с бактериальной ДНК крови при ожирении у детей и подростков недостаточно исследованы. Цель исследования — нахождение паттернов взаимодействия между долями семейств бактериальной ДНК у здоровых детей и с ожирением, анализ уровней цитокинов и их связь с бактериальной ДНК крови, оценка альфа-разнообразия микробиома крови и сходства микробиомов крови и кала. Обследовано 163 человека (дети и подростки), которых разделили на 2 группы: 80 человек с ожирением I–III степени и 83 здоровых. Материал исследования — венозная кровь. Критерии включения в группы — отсутствие приема антибиотиков, про- и пребиотиков в течение трех месяцев. Методы — мультиплексный ИФА (иммуноферментный анализ); секвенирование участка v3-v4 гена 16S рРНК. Выявлены различия в микробиоме крови на уровне семейств как по доле, так и по частоте выделения бактериальной ДНК. Более 3/4 ДНК крови в обеих группах приходилось на 19 семейств. Значимо больший вклад в альфа-разнообразие у детей с ожирением принадлежал бактериальной ДНК *Ruminococcaceae*, однако в группе здоровых детей эта роль принадлежала *Bacteroidaceae*. Анализ бета-разнообразия крови позволил выявить у детей с ожирением значимую отдаленность микробиома крови и кала, что свидетельствует о преимущественно внекишечной транслокации бактериальной ДНК. Выявлено увеличение содержания ИЛ-17А ( $p = 0,017$ ) и PD-L1 ( $p = 0,021$ ) у детей с ожирением, а также различия в микробиоме крови в группах. Определены паттерны взаимодействия между долями бактериальной ДНК, оценены уровни цитокинов.

**Ключевые слова:** ожирение, цитокины, бактериальная ДНК, микробиом крови, дети, воспаление, PD-L1

**Финансирование:** работа выполняется в рамках договора № 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 эндокринные и метаболическую функцию жировой ткани».

**Вклад авторов:** А. В. Шестопалов, С. А. Румянцев — идея, планирование эксперимента, написание и редактирование статьи; С. М. Юдин, В. В. Макаров — идея, редактирование; А. М. Гапонов — идея, планирование, редактирование; И. В. Кирилина — идея, планирование, сбор и обработка данных, написание и редактирование статьи; Т. В. Григорьева — планирование, сбор и обработка данных, редактирование; Е. Д. Теплякова — планирование эксперимента, редактирование статьи; Д. Р. Хуснутдинова — сбор данных.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено ЛНЭК ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 186 от 26 июня 2019 г.) и ЛНЭК ФГБОУ ВО РостГМУ (протокол № 20/19 от 12 декабря 2019 г.). Обязательным условием включения в исследование было добровольное подписание информированных согласий пациентами и их родителями.

✉ **Для корреспонденции:** Ирина Валерьевна Кирилина  
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; kirilina-irina@bk.ru

**Статья получена:** 13.10.2023 **Статья принята к печати:** 25.11.2023 **Опубликована онлайн:** 23.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.049

## RELATIONSHIP BETWEEN PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE LEVELS AND BLOOD BACTERIAL DNA COMPOSITION IN OBESE CHILDREN

Roumiantsev SA<sup>1,2,3</sup>, Kirilina IV<sup>1,2,3</sup>✉, Gaponov AM<sup>2</sup>, Khusnutdinova DR<sup>4</sup>, Grigoryeva TV<sup>4</sup>, Teplyakova ED<sup>5</sup>, Makarov VV<sup>6</sup>, Yudin SM<sup>6</sup>, Shestopalov AV<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Center for Digital and Translational Biomedicine, Center for Molecular Health, Moscow, Russia

<sup>3</sup> The National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

<sup>5</sup> Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

<sup>6</sup> Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia

Adipose tissue, being a source of chronic low-grade inflammation, activates cells of the immune system by producing cytokines and chemokines. The balance between pro- and anti-inflammatory molecules and their relationship with blood bacterial DNA in obese children and adolescents has not been studied sufficiently. This study aimed to find patterns of interaction between fractions of bacterial families in healthy and obese children, analyze cytokine levels and their relationship with blood bacterial DNA content, evaluate alpha diversity of blood microbiome and similarities of blood and fecal microbiomes. We examined 163 individuals (children and adolescents), who were divided into 2 groups, obese ( $n = 80$ , obesity classes I through III) and healthy ( $n = 83$ ). The material sampled and studied was venous blood. Only individuals that have not been taking antibiotics, pro- and prebiotics for at least 3 months before the study were included. The methods employed were multiplex ELISA (enzyme immunoassay) and 16S rRNA gene sequencing (region V3–V4). From the angle of bacterial families, we found differences in their content (fractions) in blood microbiome and the frequency of isolation of their DNA therein. Nineteen families accounted for over three quarters of all bacterial DNA identified in the blood. In obese children, one of the dominating roles was played by *Ruminococcaceae*, with their DNA a key part of the microbiome's alpha diversity, while in healthy participants this could be said about *Bacteroidaceae*. Analyzing beta diversity, we found that in obese children, fecal and blood microbiomes differed significantly, which indicates, mainly, extra-intestinal translocation of bacterial DNA. Obese children exhibited increased content of IL17A ( $p = 0.017$ ) and PD-L1 ( $p = 0.021$ ); there were differences in blood microbiome between groups. We identified the patterns of interaction between bacterial DNA fractions, and assessed cytokine levels.

**Keywords:** obesity, cytokines, bacterial DNA, blood microbiome, children, inflammation, PD-L1

**Funding:** the work was done in the context of agreement #0373100122119000041 under the Project "Compilation of a bank of blood serum and faecal samples from healthy donors and patients with obesity, metabolic syndrome, type II diabetes mellitus, disrupted intestinal mucosal barrier, with the aim of identifying candidate species-specific mediators of the human microbiota quorum sensing systems modulating endocrine and metabolic functions of adipose tissue."

**Author contribution:** Shestopalov AV, Roumiantsev SA — idea of the study, experiment planning, manuscript writing, editing; Yudin SM, Makarov VV — idea of the study, editing; Gaponov AM — idea, experiment planning, manuscript editing; Kirilina IV — idea, experiment planning, data processing, manuscript writing, editing; Grigoryeva TV — planning, data collection, data processing, editing; Teplyakova ED — experiment planning, manuscript editing; Khusnutdinova DR — data collection.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Local Ethics Committee of N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (Minutes #186 of June 26, 2019) and Local Ethics Committee of Rostov State Medical University (Minutes #20/19 of December 12, 2019). To be included in the study, all patients and their parents mandatorily signed voluntary informed consent forms.

✉ **Correspondence should be addressed:** Irina V. Kirilina  
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; kirilina-irina@bk.ru

**Received:** 13.10.2023 **Accepted:** 25.11.2023 **Published online:** 23.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.049

Нарушение микробиоты в организме человека приводит к изменению метаболизма и увеличению жировой ткани, постепенно способствуя развитию ожирения. Наблюдается неуклонный рост страдающих ожирением людей как среди взрослых, так и среди детей и подростков, что обуславливает актуальность поиска новых механизмов возникновения патологии. Важно своевременно выявлять предрасположенность к ожирению у детей и подростков, так как есть возможность отсрочить или в лучшем случае вообще предотвратить прогрессию заболевания, приводящую к развитию сахарного диабета II типа, дислипидемии, нарушений со стороны работы сердечно-сосудистой системы, репродуктивной системы, печени, микрососудистым нарушениям и т. д. Ожирение сопровождается морфологическими и функциональными изменениями в белой жировой ткани, привлекая иммунные клетки, такие как макрофаги, Т-клетки, В-клетки, вызывая инфильтрацию жировой ткани и таким образом запуская воспалительный процесс. Воспаление при ожирении носит вялотекущий и прогрессирующий характер, в отличие от острого воспаления, направленного на элиминацию патогена и восстановление гомеостаза. Воспалительный ответ может быть обусловлен как эндогенными (DAMP от англ. Damage Associated Molecular Patterns — молекулярный паттерн, ассоциированный с повреждением), так и экзогенными (PAMP от англ. Pathogen Associated Molecular Patterns — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) лигандами (в том числе бактериальной ДНК), распознающимися PRR (паттерн-распознающими рецепторами) [1, 2]. PRR экспрессируются в том числе и адипоцитами. Различные паттерн-распознающие рецепторы, такие как Toll-подобные рецепторы (TLR), активно участвуют в противовирусной и антибактериальной защите организма. PAMP способствуют повышению экспрессии рецепторов адипоцитов и секреции провоспалительных цитокинов и адипокинов. Активация TLR-3 запускает каскад внутриклеточных событий, сопровождающихся активацией иммунных клеток и продукцией хемокинов и провоспалительных цитокинов, таких как ФНО $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL8, хорошо известных в развитии воспаления в жировой ткани, сопровождающегося формированием инсулинорезистентности [3].

В то же время TLR участвуют в механизмах адипогенной дифференцировки, что выражается в их сочетанной экспрессии с PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors — рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом) на разных этапах дифференцировки адипоцитов [4, 5].

Однако на настоящий момент остаются неописанными изменения в содержании и таксономическом разнообразии микробиома крови и его связи с факторами воспаления.

Таким образом, целью работы было сравнение уровней содержания про- и противовоспалительных цитокинов в крови детей с ожирением и здоровых детей, а также их взаимосвязь с таксономической представленностью в

микробиоме крови; определение вклада бактериальной ДНК различных семейств в формирование альфа-разнообразия микробиома крови и его связь с микробиомом кишечника.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в 2019–2020 гг. Были обследованы 163 человека (дети и подростки), которые обратились в детскую городскую поликлинику №1 г. Ростова-на-Дону с целью очередной плановой диспансеризации. Из них 80 человек (в возрасте 10–18 лет, средний возраст составлял  $13,25 \pm 2,00$  лет) были группой наблюдения — дети с алиментарно-конституциональным ожирением разной степени, которые уже находились на диспансерном учете с установленным диагнозом (табл. 1). Группой сравнения были 83 здоровых ребенка и подростка (в возрасте 10–18 лет, средний возраст составлял  $12,92 \pm 2,21$  лет), которые не имели ожирения и других метаболических нарушений (табл. 1).

Критерии включения в обе группы: отсутствие приема антибиотиков, пробиотических и пребиотических препаратов в течение трех месяцев до включения в исследование, подписанное информированное согласие для участия в исследовании. Критерии исключения для обеих групп: тяжелые соматические заболевания (хроническая почечная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность, хроническая сердечная недостаточность), заболевания желудочно-кишечного тракта (неспецифический язвенный колит, болезнь Крона), любое заболевание в острой форме. Дополнительный критерий включения в группу наблюдения: индекс массы тела  $SDS > +2,0$  и установленный диагноз — алиментарно-конституциональное ожирение I–III степени. Исследование было одноцентровым и одномоментным со случайной выборкой участников.

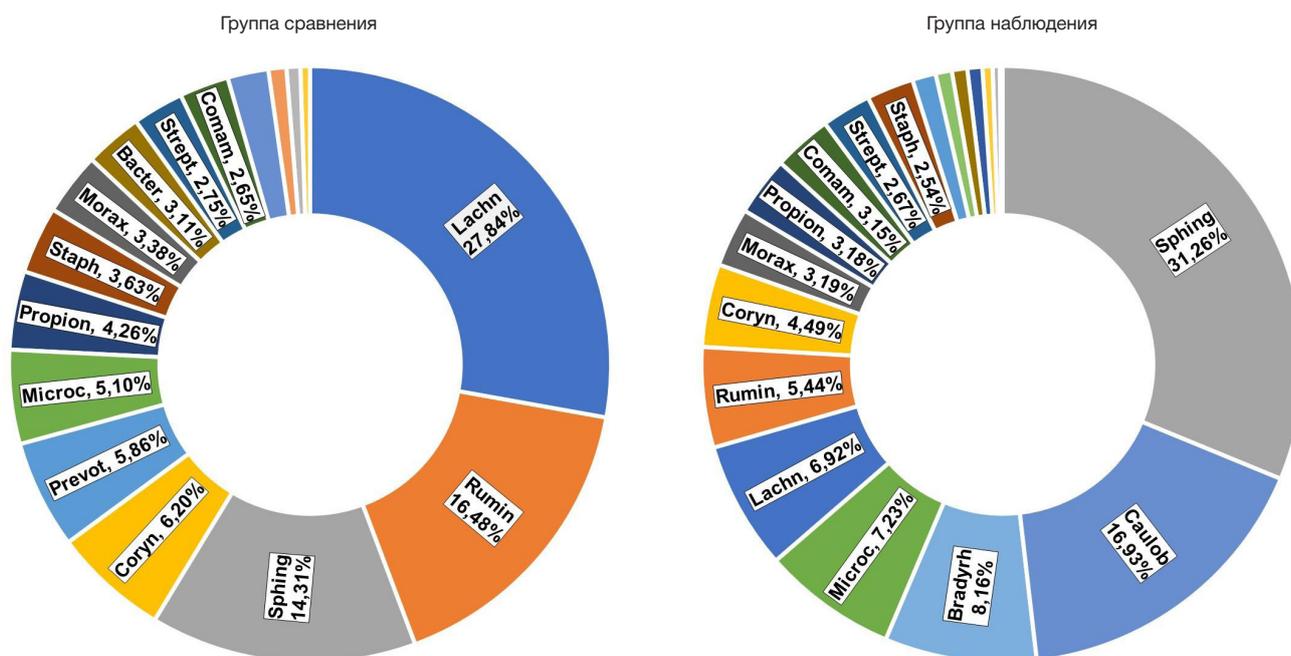
Анализ таксономического состава микробиома крови проводили на базе центра цифровой и трансляционной биомедицины ООО «Центр молекулярного здоровья», Государственного бюджетного учреждения Ростовской области Детская городская больница №1 Российского национального исследовательского университета имени Н. И. Пирогова, Казанского (Приволжского) федерального университета. У всех участников исследования проводили оценку антропометрических параметров и забор крови и кала для лабораторных исследований.

Выделение микробной ДНК из образцов крови участников исследования проводили с использованием набора QIAamp BI/Ostic Bacterimia DNA Kit (Qiagen; Германия) в соответствии с протоколом производителя. Контроль качества ДНК, его количественный и качественный состав оценивали методами спектрофотометрии (Qubit, Thermo Fisher Scientific; США) и гель-электрофореза (1% агарозы).

Подготовку библиотек и секвенирование вариабельного участка V3–V4 гена 16S рПНК проводили на платформе Illumina MiSeq (Illumina; США) согласно рекомендациям производителя. Полученные последовательности

Таблица 1. Антропометрические показатели групп

Группа	Контрольная группа	Группа наблюдения	<i>p</i>
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> , Me [Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> ]	20,1 [19,4; 21,2]	27,0 [25,9; 28,8]	< 0,001
Вес, кг, Me [Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> ]	49,0 [45,0; 55,5]	71,0 [61,0; 78,0]	< 0,001
Рост, см, Me [Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> ]	157,0 [150,0; 165,0]	159,0 [154,0; 164,0]	0,619
Возраст, лет, Me [Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> ]	13,0 [11,0; 15,0]	13,0 [11,8; 15,0]	0,237
Пол (м / ж)	57,8%/42,2%	52,5%/47,5%	0,187



**Рис. 1.** Распределение бактериальной ДНК крови идентифицированных семейств среди здоровых детей и детей с ожирением в %. *Sphing* — *Sphingomonadaceae*, *Caulob* — *Caulobacteraceae*, *Bradyrh* — *Bradyrhizobiaceae*, *Microc* — *Micrococcaceae*, *Lachn* — *Lachnospiraceae*, *Rumin* — *Ruminococcaceae*, *Coryn* — *Corynebacteriaceae*, *Morax* — *Moraxellaceae*, *Propion* — *Propionibacteriaceae*, *Comam* — *Comamonadaceae*, *Strept* — *Streptococcaceae*, *Staph* — *Staphylococcaceae*, *Prevot* — *Prevotellaceae*, *Bacter* — *Bacteroidaceae*

генов 16S рРНК («риды») были проанализированы с помощью программного обеспечения QIIME (версия 1.9.1) [6] с использованием референсной базы данных Greengenes v. 13.8 [7] с 97%-ным порогом сходства между последовательностями.

Концентрации цитокинов IL6, 8, 10, 17, ФНО $\alpha$  определяли коммерческими наборами Milliplex (Merck; Германия) — Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel; фракталкин — Human Myokine Magnetic Bead Panel; PD-L1 (лиганд 1 запрограммированной клеточной гибели, от англ. Programmed cell death-ligand 1) — Human Immunology Checkpoint Protein Panel Magnetic Bead Panel методом мультиплексного иммуноферментного анализа (ИФА) на анализаторе Magpix (Bio-Rad Laboratories; США).

Статистическая обработка данных выполнена с помощью MedCalc® Statistical Software version 20.110 (MedCalc Software Ltd; Бельгия). Все массивы данных были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Ввиду отсутствия нормального распределения, в качестве меры центральной тенденции использовали медиану и ее [25–75] перцентили. Для сравнения величин индексов бета-разнообразия (Евклидово расстояние, Манхэттенское расстояние, несходство Брея–Кертиса), уровней содержания цитокинов и анализа различий в бактериальной ДНК крови применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Сравнение частоты выявления ДНК различных семейств из образцов крови в контрольной группе и у детей с ожирением проводили с использованием хи-квадрат анализа. Вне зависимости от использованного критерия различия считались достоверными при уровне значимости  $p \leq 0,05$ . Для выявления взаимосвязи между содержанием отдельных семейств (при условии их выделения из образцов крови пациентов) и характеристиками разнообразия микробиома крови проводили расчет коэффициента корреляции Спирмена. Коэффициенты корреляции ( $\rho$ ) принимали во внимание при условии  $|\rho| \geq 0,3$  — умеренная сила связи в

соответствии со шкалой Чэддока и при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделенная из крови здоровых детей бактериальная ДНК принадлежала 29,0 [24,5–37,0] бактериальным семействам, а из крови детей с ожирением — 34,0 [28,0–42,0] семействам. Более 75% ДНК крови в обеих группах приходилось на 19 семейств: *Sphingomonadaceae*, *Caulobacteraceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Micrococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Chitinophagaceae*, *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Veillonellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Methylobacteriaceae* (рис. 1).

У детей с ожирением наблюдали статистически значимое увеличение доли ДНК: *Chitinophagaceae* ( $p < 0,001$ ), *Caulobacteraceae* ( $p < 0,001$ ), *Bradyrhizobiaceae* ( $p = 0,004$ ), *Porphyromonadaceae* ( $p = 0,091$ ) и *Sphingomonadaceae* ( $p < 0,001$ ), тогда как содержание ДНК *Prevotellaceae* ( $p < 0,001$ ) и *Lachnospiraceae* ( $p < 0,001$ ) было статистически значимо ниже по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

У детей с ожирением статистически значимо чаще выделялась бактериальная ДНК семейств: *Sphingomonadaceae* ( $p = 0,026$ ), *Ruminococcaceae* ( $p = 0,085$ ), *Caulobacteraceae* ( $p = 0,020$ ), *Bradyrhizobiaceae* ( $p < 0,001$ ), *Porphyromonadaceae* ( $p = 0,033$ ), *Chitinophagaceae* ( $p < 0,001$ ), *Pasteurellaceae* ( $p = 0,061$ ) и реже *Prevotellaceae* ( $p = 0,044$ ), *Thermaceae* ( $p = 0,084$ ) (табл. 2).

Анализ таксономической принадлежности бактериальной ДНК крови в группе детей с ожирением позволил установить повышение разнообразия бактериальной ДНК на уровне типов у детей с ожирением [8]. Представляет интерес анализ корреляционных взаимосвязей показателей альфа-разнообразия и таксономического состава бактериальной ДНК на уровне семейств. Выявлены отрицательные взаимосвязи показателей альфа-разнообразия с ДНК,

**Таблица 2.** Сравнение частоты встречаемости ДНК отдельных семейств бактерий и доли, приходящейся на эти семейства, в общем пуле бактериальной ДНК крови

Семейство	Частота встречаемости семейств у пациентов, %		Доля ДНК семейства в общем пуле бактериальной ДНК	
	Контрольная группа	Дети с ожирением	Контрольная группа	Дети с ожирением
<i>Lachnospiraceae</i>	85,5	86,3	0,1043 [0,0116–0,1954]	0,0314 [0,0074–0,0737]***
<i>Prevotellaceae</i>	84,3	71,3**	0,0220 [0,0053–0,0379]	0,0057 [0–0,0167]***
<i>Sphingomonadaceae</i>	84,3	95,0**	0,0536 [0,0115–0,1444]	0,1418 [0,0675–0,1946]***
<i>Comamonadaceae</i>	84,3	92,5	0,0100 [0,0029–0,0252]	0,0143 [0,0051–0,0371]*
<i>Ruminococcaceae</i>	71,1	82,5*	0,0618 [0–0,1281]	0,0247 [0,0035–0,0753]
<i>Caulobacteraceae</i>	65,1	81,3**	0,0082 [0–0,0750]	0,0768 [0,0148–0,1052]***
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	49,4	78,8***	0 [0–0,3148]	0,0370 [0,0031–0,3191]**
<i>Porphyromonadaceae</i>	44,6	61,3**	0 [0–0,0097]	0,0036 [0; 0,0113]*
<i>Chitinophagaceae</i>	32,5	65,0***	0 [0–0,0039]	0,0039 [0–0,0118]***
<i>Pasteurellaceae</i>	22,9	36,3*	0 [0–0]	0 [0–0,0025]
<i>Thermaceae</i>	36,1	23,8*	0 [0–0,0053]	0 [0–0]*

**Примечание:** различия достоверны по сравнению с контрольной группой: \* $p < 0,1$ ; \*\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

относящейся к семействам — *Corynebacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Caulobacteraceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Moraxellaceae* — как в контрольной группе, так и у детей с ожирением.

Вместе с тем бактериальная ДНК только четырех семейств устанавливает положительные корреляции с показателями разнообразия микробиома крови, причем преимущественно биотопами являются толстый кишечник (*Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*) и ротовая полость (*Prevotellaceae*) (табл. 3).

Для выявления биотопов, формирующих микробиом крови, был проведен корреляционный анализ между характеристиками альфа-разнообразия долями бактериальной ДНК, приходящейся на отдельные семейства. Обнаружены положительные корреляции с *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*. Положительные корреляции возникли с ДНК микроорганизмов, населяющих главным образом два биотопа — толстый кишечник и ротовую полость, а также верхние дыхательные пути, мочеполовую систему; отрицательные — с ДНК бактерий, обнаруживаемых в толстом кишечнике, на кожных покровах, ротоглотке, носоглотке, пищеводе, желудке, воде, почве.

Примечательно, что у детей с ожирением наблюдается разнонаправленное изменение выраженности положительных корреляционных связей индексов альфа-разнообразия с семействами из одного и того же биотопа — снижение с семейством *Bacteroidaceae* и увеличение с семейством *Ruminococcaceae*.

Обращает также внимание снижение при ожирении крайне выраженных отрицательных корреляционных связей индексов альфа-разнообразия с ДНК семейств *Caulobacteraceae* и *Bradyrhizobiaceae* и появление отрицательных корреляций с ДНК семейства *Porphyromonadaceae* на фоне статистически значимого повышения их частоты встречаемости и доли в общем пуле бактериальной ДНК крови. Представители семейств *Caulobacteraceae* — обитатели почвы и воды, а *Bradyrhizobiaceae* входит в состав ядра микробиома грудного молока.

При анализе корреляций в группах здоровых детей и детей с ожирением выявлена различная архитектура взаимосвязей между ДНК различных таксономических

групп, содержащая как общие для обеих групп паттерны взаимосвязей, так и уникальные для каждой группы.

Обращает внимание, что в центре корреляционных связей находится ДНК семейства *Propionibacteriaceae*, которая устанавливает взаимосвязи с двумя паттернами корреляции. Один паттерн включает *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae*, другой — *Enterobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Comamonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Micrococcaceae*, *Caulobacteraceae*, *Sphingomonadaceae* (рис. 2, 3).

Примечательно, что в группе детей с ожирением возникает больше уникальных корреляционных взаимосвязей, и они образованы в основном ДНК микробиома внекишечных биотопов (кожа, ротовая полость, почва, вода).

Анализ бета-разнообразия проводили между микробиомами крови и кала. Данный анализ выявил значимое повышение показателей бета-разнообразия в группе детей с ожирением (Евклидово расстояние  $p = 0,03$ , Манхэттенское расстояние  $p = 0,07$ , несходство Брея-Кертиса  $p = 0,07$ ), что свидетельствует о большем различии между микробиомами крови и кала у детей с ожирением. Это, в свою очередь, говорит о снижении доли кишечного микробиома в формировании микробиома крови и возрастании доли внекишечных микробиомов (рис. 4).

Таким образом, показанные нами ранее незначительное повышение альфа-разнообразия микробиома крови у детей с ожирением в виде статистически значимого увеличения количества операционных таксономических единиц (OTUs) и тенденции роста индекса филогенетического разнообразия (PD) дополняются данными о бета-разнообразии и корреляционных связях между ДНК различных семейств, которые свидетельствуют о том, что при ожирении повышение альфа-разнообразия микробиома крови сопровождается удалением его от микробиома кишечника, т. е. разнообразие достигается путем обогащения микробиома крови ДНК из внекишечных микробиомов [8].

Исследование уровня содержания цитокинов у детей с ожирением выявило статистически значимое увеличение IL17A и PD-L1 по сравнению со здоровыми детьми (табл. 4).

На основании проведенного корреляционного анализа установлены статистически значимые положительные взаимосвязи в группе детей с ожирением (табл. 5).

Таблица 3. Взаимосвязи между характеристиками альфа-разнообразия и бактериальной ДНК микробиома крови на таксономическом уровне — семейства

	Контрольная группа	Дети с ожирением
	Семейство <i>Bacteroidaceae</i>	
Индекс Shannon	$\rho = 0,669, p < 0,001, n = 57$	$\rho = 0,358^*, p = 0,015, n = 46$
Индекс Simpson	$\rho = 0,666, p < 0,001, n = 57$	$\rho = 0,356^*, p = 0,015, n = 46$
Индекс Chao1	$\rho = 0,533, p < 0,001, n = 57$	
Индекс PD	$\rho = 0,586, p < 0,001, n = 57$	
OTUs	$\rho = 0,575, p < 0,001, n = 57$	
Семейство <i>Prevotellaceae</i>		
Индекс Shannon	$\rho = 0,680, p < 0,001, n = 70$	$\rho = 0,540, p < 0,001, n = 56$
Индекс Simpson	$\rho = 0,678, p < 0,001, n = 70$	$\rho = 0,537, p < 0,001, n = 56$
Индекс Chao1	$\rho = 0,320, p < 0,001, n = 70$	$\rho = 0,358, p = 0,007, n = 56$
Индекс PD	$\rho = 0,535, p < 0,001, n = 70$	$\rho = 0,329, p = 0,013, n = 56$
OTUs	$\rho = 0,445, p < 0,001, n = 70$	$\rho = 0,333, p = 0,012, n = 56$
Семейство <i>Lachnospiraceae</i>		
Индекс Shannon	$\rho = 0,593, p < 0,001, n = 71$	$\rho = 0,638, p < 0,001, n = 68$
Индекс Simpson	$\rho = 0,614, p < 0,001, n = 71$	$\rho = 0,627, p < 0,001, n = 68$
Индекс Chao1	$\rho = 0,348, p = 0,003, n = 71$	$\rho = 0,368, p = 0,002, n = 68$
Индекс PD	$\rho = 0,369, p = 0,002, n = 71$	$\rho = 0,365, p = 0,002, n = 68$
OTUs	$\rho = 0,345, p = 0,003, n = 71$	$\rho = 0,321, p = 0,008, n = 68$
Семейство <i>Ruminococcaceae</i>		
Индекс Shannon	$\rho = 0,308, p = 0,018, n = 59$	$\rho = 0,714^*, p < 0,001, n = 65$
Индекс Simpson	$\rho = 0,357, p = 0,006, n = 59$	$\rho = 0,706^*, p < 0,001, n = 65$
Индекс Chao1		$\rho = 0,394, p = 0,001, n = 65$
Индекс PD		$\rho = 0,461, p < 0,001, n = 65$
OTUs		$\rho = 0,390, p = 0,001, n = 65$

Примечание: \* — достоверность различий коэффициентов корреляций между контрольной группой и группой детей с ожирением.

В группе здоровых детей корреляционный анализ позволил установить следующие взаимосвязи между цитокинами и бактериальной ДНК на уровне семейств: IL10 умеренно положительно коррелировал с бактериальной ДНК *Erysipelotrichaceae* ( $\rho = 0,438, p = 0,005, n = 40$ ); IL8 умеренно положительно коррелировал с *Bacteroidaceae* ( $\rho = 0,370, p = 0,005, n = 57$ ), IL6 с *Pseudomonadaceae* ( $\rho = 0,528, p = 0,012, n = 22$ ); IL17A с *Microbacteriaceae* ( $\rho = 0,544, p = 0,006, n = 23$ ), *Bacillaceae* ( $\rho = 0,796, p < 0,001, n = 18$ ), *Fusobacteriaceae* ( $\rho = 0,506, p = 0,032, n = 18$ ); PD-L1 с [*Tissierellaceae*] ( $\rho = 0,353, p = 0,044, n = 33$ ), *Pseudomonadaceae* ( $\rho = 0,528, p = 0,012, n = 22$ ).

У детей с ожирением выявлена умеренно положительная взаимосвязь IL10 с *Lactobacillaceae* ( $\rho = 0,395, p = 0,034, n = 29$ ), IL8 с *Veillonellaceae* ( $\rho = 0,354, p = 0,017, n = 45$ ); IL6 с *Nocardiaceae* ( $\rho = 0,605, p = 0,010, n = 17$ ), *Lactobacillaceae* ( $\rho = 0,380, p = 0,042, n = 29$ ), *Veillonellaceae* ( $\rho = 0,459, p = 0,002, n = 45$ ); IL17A с *Nocardiaceae* ( $\rho = 0,521, p = 0,032, n = 17$ ), ФНО $\alpha$  с *Nocardiaceae* ( $\rho = 0,495, p = 0,043, n = 17$ ), фракталкин с *Bacillaceae* ( $\rho = 0,705, p = 0,010, n = 12$ ).

Выявленные корреляционные взаимосвязи между бактериальной ДНК и содержанием цитокинов в группах детей ассоциированы с разными семействами. В группе здоровых детей системный провоспалительный цитокин IL8 коррелирует с бактериальной ДНК *Bacteroidaceae*, которые выполняют в кишечнике защитную функцию, у детей с ожирением данной корреляции не выявлено. Следует также отметить, что взаимосвязи в контрольной группе выявлены с семействами, принадлежащими пяти

филумам — *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*; у детей с ожирением только с семействами, принадлежащими двум филумам: *Firmicutes* и *Actinobacteria*.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты нашего исследования показали, что дети и подростки с ожирением характеризуются статистически значимо повышенными уровнями IL17A и PD-L1. В норме IL17A принимает участие в поддержании целостности эпителиального барьера слизистых оболочек посредством регулирования белков плотных контактов (окклюдина), однако главная функция заключается в рекрутировании нейтрофилов в кишечник при угрозе излишней проницаемости и в целях поддержания гомеостаза. В одном из исследований было показано, что ингибирование IL17A или IL17RA сопровождалось серьезным ослаблением эпителиального барьера [9]. IL17A также главный регулятор взаимодействия между организмом хозяина и микробиотой как на физиологическом уровне, так и при иммуноопосредованных воспалительных заболеваниях [10]. В экспериментах на мышах нокаут гена IL17 индуцировал развитие воспаления кишечника [11]. Вместе с тем в исследованиях, проведенных на трансгенной мышью модели рассеянного склероза HLA-DR3, показано, что дефицит IL17A (мышь HLA-DR3.IL17A $^{-/-}$ ) приводит к увеличению количества Treg-индуцирующих кишечных бактерий, таких как *Prevotella*, *Parabacteroides* и *Bacteroides*, что приводит к более легкому течению заболевания. Было также показано, что IL17A

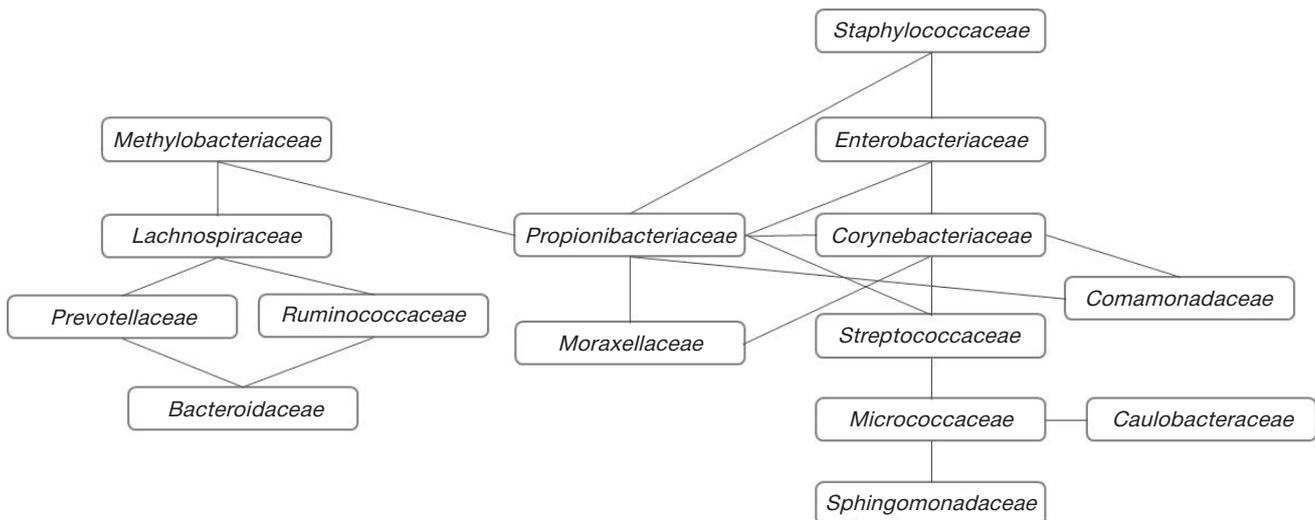


Рис. 2. Положительные корреляционные взаимосвязи между бактериальной ДНК в группе здоровых детей

может регулировать активность Treg и влиять на течение заболевания путем модуляции микробиоты кишечника и обеспечивает новый механизм, с помощью которого иммуномедиаторы влияют на микробиоту кишечника. Интересно, что у мышей DR3 с достаточным содержанием IL17A заболевание протекает в более легкой форме при содержании с мышами с дефицитом IL17A, тем самым подчеркивая доминирующую роль микробиоты в индукции Treg и снижении тяжести заболевания [12]. IL17A принимает участие и в патогенезе аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, псориаз, системная красная волчанка, бронхиальная астма и др. [13]. Лечение спондилоартрита и псориатического артрита путем ингибирования IL17 приводило к уменьшению содержания *Clostridiales* и увеличению *Bacteroidales*. Таким образом, можно предположить, что, имея повышенный уровень IL17A, дети с ожирением попадают в зону риска развития аутоиммунных заболеваний.

PD-L1 представляет собой лиганд, который играет важную роль в ингибировании опосредованного T-клетками иммунного ответа [14]. Связывание PD-L1 с PD-1 вызывает апоптоз эффекторных T-клеток и ускользание опухолевых клеток от иммунитета, что приводит к неблагоприятному прогнозу при онкологии. В ряде работ показано, что ингибирование взаимодействия между PD-L1 с PD-1 усиливает адаптивный иммунный ответ, и повышается

противоопухолевая активность [15–17]. Также выявлено, что PD-L1 экспрессируется на белых и бурых адипоцитах у мышей [18]. PD-L1 — не столь однозначная молекула: ее низкая экспрессия или нокаут на адипоцитах повышает противоопухолевый иммунитет при наличии опухоли у мышей, а в отсутствие опухоли абляция PD-L1 адипоцитов усугубляет обусловленное диетой увеличение массы тела, инфильтрацию провоспалительных макрофагов в жировую ткань и резистентность к инсулину [19]. PD-L1 обладает двояким эффектом: с одной стороны, снижение экспрессии повышает противоопухолевый иммунитет и подавляет рост опухоли, а с другой — увеличение экспрессии в адипоцитах позволяет поддерживать гомеостаз жировой ткани и смягчать вялотекущее воспаление, связанное с разрастанием жировой ткани и инфильтрацией ее макрофагами [20]. Микробиом кишечника может модулировать ответ пациентов с меланомой на иммунотерапию PD-1. По предположению авторов, пациенты с «благоприятным» микробиомом кишечника (например, с высоким разнообразием и обилием *Ruminococcaceae* и *Faecalibacterium*) имеют усиленный системный и противоопухолевый иммунный ответ, опосредованный улучшением презентации антигена и функции эффекторных T-клеток на периферии и в микроокружении опухоли. Напротив, пациенты с «неблагоприятным» микробиомом кишечника (например,

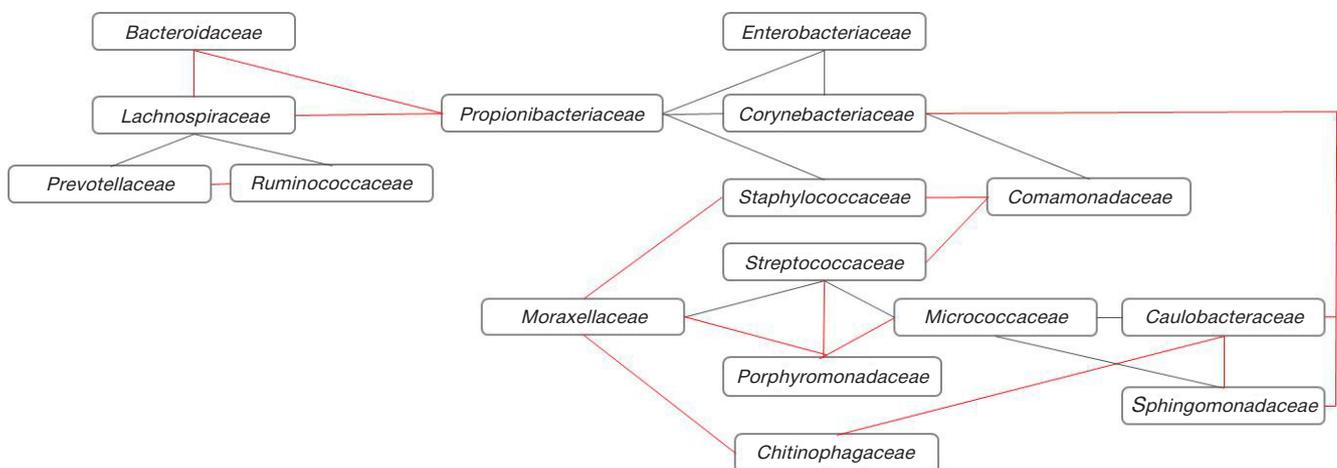


Рис. 3. Положительные корреляционные взаимосвязи между бактериальной ДНК в группе детей с ожирением. Красным выделены уникальные корреляции в группе детей с ожирением, черным — единые с контрольной группой

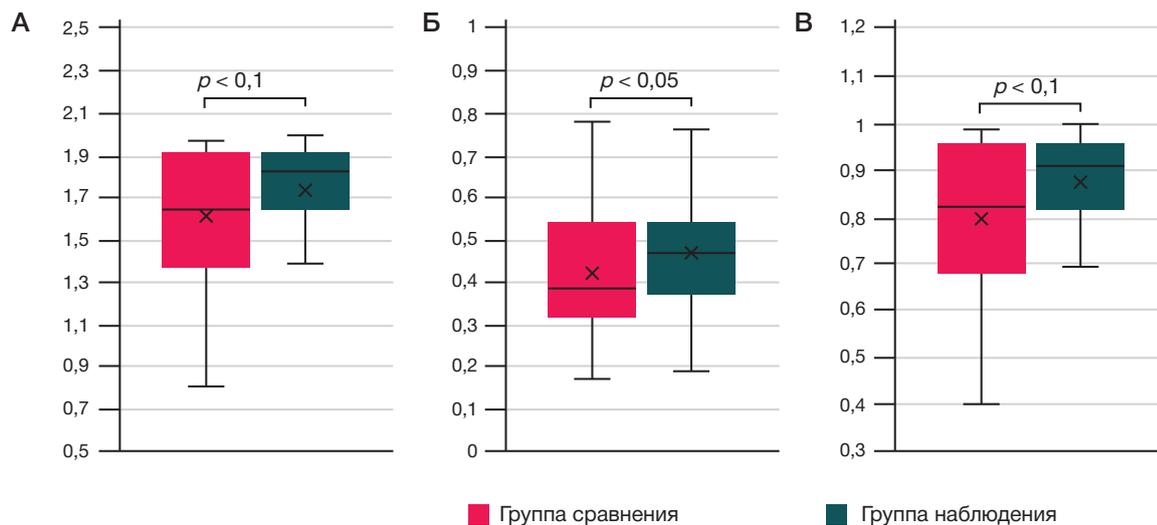


Рис. 4. Бета-разнообразие в группах детей. А. Манхэттенское расстояние. Б. Евклидово расстояние. В. Несходство Брея–Кертиса

с низким разнообразием и высокой относительной численностью *Bacteroidales*) имеют нарушенные системные и противоопухолевые иммунные реакции, опосредованные ограниченной внутриопухолевой лимфоидной и миелоидной инфильтрацией и ослабленной способностью к презентации антигенов. Эти результаты подчеркивают терапевтический потенциал модуляции микробиома кишечника у пациентов, получающих иммунотерапию с блокадой контрольных точек [21].

Несмотря на схожесть доминирующих семейств микробиома крови, в обеих обследованных группах детей и подростков найдены статистически значимые различия как по частоте выделения бактериальной ДНК крови, так и по долям, приходящимся на семейства в группе детей с ожирением. Из этого можно предположить, что у детей происходят значительные нарушения в проницаемости как кишечника, так и других биотопов, главным образом кожи. Изменение микробиоты оказывает влияние на качество и количество пристеночной микробиоты, процессы выработки бокаловидными клетками кишечника слизи, защищающей от проникновения патогенов. В группе детей с ожирением мы показали, что ДНК семейства *Bacteroidaceae* вносит значимо меньший вклад в альфа-разнообразие микробиома крови, что сопоставимо с данными других исследователей по микробиому кала [8]. Доказано, что увеличение доли *Proteobacteria* при ожирении,

неалкогольной жировой болезни печени и неалкогольном стеатогепатите [22–24] является предрасполагающим фактором нарушения работы печени и всего желудочно-кишечного тракта. Статистически значимое снижение доли *Lachnospiraceae* в группе детей с ожирением влечет за собой снижение синтеза бутирата, следовательно, снижается энергообеспечение клеток кишечного эпителия и утончается кишечный барьер в связи со снижением активации белка клаудина-1 [25]. Исследования показывают, что *Ruminococcaceae* сопряжены с развитием воспалительных заболеваний кишечника, таких как язвенный колит и болезнь Крона.

Основной биотоп *Ruminococcaceae* — это толстый кишечник, для *Bacteroidaceae* — толстый кишечник, ротовая полость, верхние дыхательные пути, мочеполовая система, а для *Prevotellaceae* — ротовая полость, что позволяет предположить снижение транслокации бактериальной ДНК из ротовой полости.

Согласно литературным данным у детей и подростков с ожирением были выявлены позитивные корреляционные взаимосвязи между содержанием трефоиловых факторов, а именно TFF3 с микробиотой кишечника, свидетельствующие о нарушении толерантности мукозального барьера к микробному сообществу [26].

Таким образом, вероятно, у детей с ожирением вследствие нарушения периферической толерантности и

Таблица 4. Содержание про- и противовоспалительных цитокинов у детей в сыворотке крови

Анализируемый показатель	Здоровые дети (n = 83)	Дети с ожирением (n = 80)	p-величина
IL6, пг/мл, Ме [Q <sub>1</sub> ;Q <sub>3</sub> ]	1,09 [0,28; 6,58]	1,19 [0,52; 8,24]	0,561
IL8, пг/мл, Ме [Q <sub>1</sub> ;Q <sub>3</sub> ]	8,65 [4,05; 16,3]	11,5 [6,08; 21,4]	0,103
IL10, пг/мл, Ме [Q <sub>1</sub> ;Q <sub>3</sub> ]	1,93 [0,67; 4,08]	2,30 [0,94; 6,02]	0,357
IL17A, пг/мл, Ме [Q <sub>1</sub> ;Q <sub>3</sub> ]	0,69 [0,13; 4,88]	4,22 [0,39; 9,56]**	0,017
ФНОα, пг/мл, Ме [Q <sub>1</sub> ;Q <sub>3</sub> ]	12,8 [7,74; 21,8]	13,2 [9,00; 20,7]	0,856
Фракталкин, пг/мл, Ме [Q <sub>1</sub> ;Q <sub>3</sub> ]	63,1 [47,1; 228]	90,8 [34,5; 209]	0,188
PD-L1, пг/мл, Ме [Q <sub>1</sub> ;Q <sub>3</sub> ]	25,8 [9,10; 53,1]	35,7 [19,5; 55,0]**	0,021

Примечание: различия достоверны по сравнению с контрольной группой: \* $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Таблица 5. Статистические параметры корреляционного анализа цитокинов у детей

	Дети с ожирением				Здоровые дети		
	IL6	IL8	IL10	IL17A	IL6	IL8	IL17A
IL8	rho = 0,583 p < 0,001 n = 80				rho = 0,439 p < 0,001 n = 83		
IL17A	rho = 0,505 p < 0,001 n = 80	rho = 0,391 p < 0,001 n = 80	rho = 0,349 p = 0,001 n = 80		rho = 0,344 p = 0,001 n = 83	rho = 0,446 p < 0,001 n = 83	
IL10	rho = 0,383 p < 0,001 n = 80						
ФНО $\alpha$		rho = 0,441 p < 0,001 n = 80	rho = 0,400 p < 0,001 n = 80	rho = 0,427 p < 0,001 n = 80			rho = 0,316 p = 0,004 n = 83

проницаемости мукозальных барьеров происходит усиленная транслокация бактериальной ДНК не только из кишечника, но и из ротовой полости и кожных покровов. В результате транслокации повышается разнообразие микробиома крови. Бактериальная ДНК активирует рецепторы TLR9 и запускает секрецию провоспалительных цитокинов, в частности, IL17A, вынуждая организм поддерживать баланс и активировать запуск противовоспалительных механизмов путем активации синтеза PD-L1.

## ВЫВОДЫ

Увеличение альфа-разнообразия в группе детей с ожирением наблюдается за счет бактериальной ДНК семейств *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae*.

При ожирении увеличивается бета-разнообразие, что свидетельствует об увеличении транслокации бактериальной ДНК из внекишечных микробиомов. Появляются новые паттерны взаимосвязей по сравнению с паттернами взаимодействия в контрольной группе. У детей с ожирением повышение уровней IL17A и PD-L1 свидетельствует об активации про- и противовоспалительных механизмов и развитии вялотекущего воспаления. Ожирение характеризуется появлением значимых корреляций ДНК семейства *Nocardiaceae* с провоспалительными цитокинами, что свидетельствует о роли транслокации ДНК этого таксона в развитии вялотекущего воспаления и возможности разработки подходов по снижению этой транслокации в лечении ожирения.

## Литература

- Shin JJ, Lee EK, Park TJ, Kim W. Damage associated molecular patterns and their pathological relevance in diabetes mellitus. *Ageing Research Reviews*. 2015; 24 (Pt A): 66–76. Epub 2015 Jul 18.
- Land WG. The role of damage-associated molecular patterns in human diseases: part I — promoting inflammation and immunity. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. 2015; 15: 9–21.
- Ballak D, van Asseldonk E, van Diepen J, et al. TLR-3 is present in human adipocytes, but its signalling is not required for obesity-induced inflammation in adipose tissue in vivo. *PLoS ONE*. 2015; 10 (4): e0123152.
- Yu L, Li Y, Du C, Zhao W, Zhang H, Yang Y, et al. Pattern recognition receptor-mediated chronic inflammation in the development and progression of obesity-related metabolic diseases. *Hindawi Mediators of Inflamm*. 2019 Sep; 2019: 5271295. PubMed PMID: 31582899. PubMed Central PMCID: PMC6754942.
- Christodoulides C, Vidal-Puig A. PPARs and adipocytes function. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Apr; 318 (1–2): 61–8. Epub 2009 Sep 20.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010 May; 7 (5): 335–6. Epub 2010 Apr 11.
- DeSantis T, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72 (7): 5069–72.
- Кирилина ИБ, Шестопалов АВ, Гапонов АМ, Камальдинова ДР, Хуснутдинова ДР, Григорьева ТВ и др. Особенности микробиома крови у детей с ожирением. *Педиатрия*. 2022; 101 (5): 15–22.
- Maxwell JR, Zhang Y, Brown WA, Smith CL, Byrne FR, Fiorino M et al. Differential roles for Interleukin-23 and Interleukin-17 in intestinal immunoregulation. *Immunity*. 2015; 43: 739–50.
- Brevi A, Cogrossi LL, Grazi G, Masciovecchio D, Impellizzeri D, Lacanfora L, et al. Much more than IL-17A: cytokines of the IL-17 family between microbiota and cancer. Mini review article *Front. Immunol. Sec. Cancer Immunity and Immunotherapy*. 2020 Nov; 11: 565470.
- Bi Y, Li C, Liu L, Zhou J, Li Z, Deng H, et al. IL-17A-dependent gut microbiota is essential for regulating diet-induced disorders in mice. *Science Bulletin*. 2017; 62 (15): 1052–63.
- Shahi SK, Ghimire S, Jensen SN, Lehman P, Borchering N, Gibson-Corley KN, et al. IL-17A controls CNS autoimmunity by regulating gut microbiota and inducing regulatory T cells *bioRxiv*. 2022 Apr; 04.22.489206.
- Chen K, Kolls JK. Interleukin-17A (IL17A). *Gene*. 2017; 30 (614): 8–14. Epub 2017 Jan 22.
- Wang X, Teng F, Kong Li, Jinming Yu. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther*. 2016; 9: 5023–39.
- Wu Y, Chen W, Xu ZP, Gu W. PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy-blockade, knockdown, or inhibition. *Front Immunol*. 2019; 10: 2022.
- Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Ge J, Xiang B, et al. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol Cancer*. 2019; 18 (1): 10.
- Dermani FK, Samadi P, Rahmani G, Kohlan AK, Najafi R. PD1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. *J Cell Physiol*. 2019; 234 (2): 1313–25.
- Ingram JR, Dougan M, Rashidian M, Knoll M, Keliher EJ, Garrett S, et al. PD-L1 is an activation-independent marker of brown adipocytes. *Nature Communication*. 2017 Sep 21; 8 (1): 647.
- Wu B, Chiang H-C, Sun X, Yuan B, Mitra P, Hu Y, et al. Genetic ablation of adipocyte PD-L1 reduces tumor growth but accentuates obesity-associated inflammation. *J Immunother Cancer*. 2020 Aug; 8 (2): e000964. PubMed PMID: 32817394.

- PubMed Central PMCID: PMC7437875.
- Fujii T, Nishiki E, Endo M, Yajima R, Katayama A, Oyama T. Implication of atypical supraclavicular F18-fluorodeoxyglucose uptake in patients with breast cancer: Relationship between brown adipose tissue and TILs, PD-L1. Posters A: Risk factors. 2020 Oct; (Suppl 1): S94.
  - Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018 Jan 5; 359 (6371): 97–103. Epub 2017 Nov 2.
  - Плотникова Е. Ю., Краснов О. А. Метаболический синдром и кишечная микрофлора; что общего? Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015; 112 (12): 64–73.
  - Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013; 58: 120–7.
  - Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*. 2012; 57: 601–9.
  - Лоранская И. Д., Халиф И. Л., Болдырева М. Н., Купаева В. А. Характеристика микробиома при воспалительных заболеваниях кишечника. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018; 153 (5): 104–11.
  - Шестопалов А. В., Колесникова И. М., Савчук Д. В., Теплякова Е. Д., Шин В. А., Григорьева Т. В. и др. Влияние вида вскармливания на таксономический состав кишечного микробиома и уровни треfoilовых факторов у детей и подростков. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2023; 109 (5): 656–72.
- ### References
- Shin JJ, Lee EK, Park TJ, Kim W. Damage associated molecular patterns and their pathological relevance in diabetes mellitus. *Ageing Research Reviews*. 2015; 24 (Pt A): 66–76. Epub 2015 Jul 18.
  - Land WG. The role of damage-associated molecular patterns in human diseases: part I — promoting inflammation and immunity. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. 2015; 15: 9–21.
  - Ballak D, van Asseldonk E, van Diepen J, et al. TLR-3 is present in human adipocytes, but its signalling is not required for obesity-induced inflammation in adipose tissue in vivo. *PLoS ONE*. 2015; 10 (4): e0123152.
  - Yu L, Li Y, Du C, Zhao W, Zhang H, Yang Y, et al. Pattern recognition receptor-mediated chronic inflammation in the development and progression of obesity-related metabolic diseases. *Hindawi Mediators of Inflamm*. 2019 Sep; 2019: 5271295. PubMed PMID: 31582899. PubMed Central PMCID: PMC6754942.
  - Christodoulides C, Vidal-Puig A. PPARs and adipocytes function. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Apr; 318 (1–2): 61–8. Epub 2009 Sep 20.
  - Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010 May; 7 (5): 335–6. Epub 2010 Apr 11.
  - DeSantis T, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72 (7): 5069–72.
  - Kirilina IV, Shestopalov AV, Gaponov AM, Kamaldinova DR, Khusnutdinova DR, Grigorjeva TV, et al. Features of the blood microbiome in obese children. *Pediatrics n.a. G. N. Speransky*. 2022; 101 (5): 15–22. Russian.
  - Maxwell JR, Zhang Y, Brown WA, Smith CL, Byrne FR, Fiorino M et al. Differential roles for Interleukin-23 and Interleukin-17 in intestinal immunoregulation. *Immunity*. 2015; 43: 739–50.
  - Brevi A, Cogrossi LL, Grazi G, Masciovecchio D, Impellizzeri D, Lacanfora L, et al. Much more than IL-17A: cytokines of the IL-17 family between microbiota and cancer. Mini review article *Front. Immunol. Sec. Cancer Immunity and Immunotherapy*. 2020 Nov; 11: 565470.
  - Bi Y, Li C, Liu L, Zhou J, Li Z, Deng H, et al. IL-17A-dependent gut microbiota is essential for regulating diet-induced disorders in mice. *Science Bulletin*. 2017; 62 (15): 1052–63.
  - Shahi SK, Ghimire S, Jensen SN, Lehman P, Borcharding N, Gibson-Corley KN, et al. IL-17A controls CNS autoimmunity by regulating gut microbiota and inducing regulatory T cells *bioRxiv*. 2022 Apr; 04.22.489206.
  - Chen K, Kolls JK. Interleukin-17A (IL17A). *Gene*. 2017; 30 (614): 8–14. Epub 2017 Jan 22.
  - Wang X, Teng F, Kong Li, Jinming Yu. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther*. 2016; 9: 5023–39.
  - Wu Y, Chen W, Xu ZP, Gu W. PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy-blockade, knockdown, or inhibition. *Front Immunol*. 2019; 10: 2022.
  - Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Ge J, Xiang B, et al. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol Cancer*. 2019; 18 (1): 10.
  - Dermani FK, Samadi P, Rahmani G, Kohlan AK, Najafi R. PD1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. *J Cell Physiol*. 2019; 234 (2): 1313–25.
  - Ingram JR, Dougan M, Rashidian M, Knoll M, Keliher EJ, Garrett S, et al. PD-L1 is an activation-independent marker of brown adipocytes. *Nature Communication*. 2017 Sep 21; 8 (1): 647.
  - Wu B, Chiang H-C, Sun X, Yuan B, Mitra P, Hu Y, et al. Genetic ablation of adipocyte PD-L1 reduces tumor growth but accentuates obesity-associated inflammation. *J Immunother Cancer*. 2020 Aug; 8 (2): e000964. PubMed PMID: 32817394. PubMed Central PMCID: PMC7437875.
  - Fujii T, Nishiki E, Endo M, Yajima R, Katayama A, Oyama T. Implication of atypical supraclavicular F18-fluorodeoxyglucose uptake in patients with breast cancer: Relationship between brown adipose tissue and TILs, PD-L1. Posters A: Risk factors. 2020 Oct; (Suppl 1): S94.
  - Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018 Jan 5; 359 (6371): 97–103. Epub 2017 Nov 2.
  - Plotnikova EY, Krasnov OA. Metabolic syndrome and intestinal microflora: what overall? *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2015; 112 (12): 64–73. Russian.
  - Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013; 58: 120–7.
  - Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*. 2012; 57: 601–9.
  - Loranskaya ID, Khalif IL, Boldyreva MN, Kupaeva VA. Characteristic of microbiome in inflammatory bowel disease. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2018; 153 (5): 104–11. Russian.
  - Shestopalov AV, Kolesnikova IM, Savchuk DV, Teplyakova ED, Shin VA, Grigoryeva TV, et al. Effect of the infant feeding type on gut microbiome taxonomy and levels of trefoil factors in children and adolescents. *Russian Journal of Physiology*. 2023; 109 (5): 656–72. Russian.

## ИЗМЕНЕНИЯ ЦИРКАДИАНЫХ РИТМОВ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В ПОСТКОВИДНОМ ПЕРИОДЕ

О. А. Радаева<sup>1</sup>✉, А. С. Симбирцев<sup>2</sup>, Ю. А. Костина<sup>1</sup>, М. С. Искандярова<sup>1</sup>, Е. В. Негоднова<sup>1</sup>, С. В. Машнина<sup>1</sup>, В. В. Еремеев<sup>1</sup>, К. А. Красноглазова<sup>1</sup>, И. О. Бабушкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва, Саранск, Россия

<sup>2</sup> Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Несмотря на большое число исследований, посвященных количественным характеристикам цитокинового профиля пациентов с различными заболеваниями, нет точных референсных интервалов. Не менее важно, что ограничено число работ, анализирующих циркадианные ритмы синтеза цитокинов у лиц с артериальной гипертензией. Целью работы было проанализировать особенности циркадианных ритмов содержания цитокинов (IL18, IL18 BP, LIF, sLIFr, M-CSF, MCSFR) в крови пациентов с эссенциальной артериальной гипертензией II стадии и выделить патогенетически значимые особенности, сформированные после перенесенной новой коронавирусной инфекции. Проводили забор крови в 7.00–8.00, 12.00–13.00, 19.00–20.00.00, 00.00–1.00 для определения иммуноферментным методом уровней IL18, IL18 BP, LIF, sLIFr, M-CSF, MCSFR в течение трех суток у 18 пациентов (56 (95% ДИ (54–69) лет) с эссенциальной артериальной гипертензией (ЭАГ) до и после перенесенной новой коронавирусной инфекции. Полученные данные демонстрируют изменения циркадианных ритмов содержания цитокинов в периферической крови у пациентов в зависимости от наличия ЭАГ, а также их дополнительное искажение в постковидном периоде, что в значимом проценте случаев имеет стойкий характер с сохранением более шести месяцев в виде снижения содержания IL18 BP ( $p < 0,001$ ), двукратного увеличения sLIFr и MCSF ( $p < 0,001$ ) в 18.00. Определена достоверная связь между циркадианными ритмами содержания sLIFr в крови и изменением уровня систолического АД с формированием патологического ритма с ростом АД в ночное время (Найт-пикер) у лиц с ЭАГ в постковидном периоде. Полученные фундаментальные данные открывают перспективы для новых исследований иммунопатогенеза постковидного периода у лиц с гипертензией с учетом циркадианных ритмов содержания цитокинов в крови.

**Ключевые слова:** эссенциальная гипертензия, LIF, sLIFr, M-CSF, циркадианные ритмы

**Финансирование:** поддержано грантом РНФ «Анализ изменения циркадианных ритмов синтеза цитокинов в крови пациентов с эссенциальной артериальной гипертензией как предиктор развития сердечно-сосудистых осложнений», № 23-25-00147.

**Вклад авторов:** О. А. Радаева — дизайн исследования, анализ результатов, оформление рукописи; А. С. Симбирцев — формулирование цели исследования, редактирование; Ю. А. Костина — лабораторные исследования, оформление рукописи; М. С. Искандярова — работа с литературой, редактирование; Е. В. Негоднова — работа с литературой, наблюдение за пациентами; С. В. Машнина, К. А. Красноглазова, И. О. Бабушкин — статистическая обработка данных; В. В. Еремеев — редактирование.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Мордовского государственного университета имени Н. П. Огарева (протокол № 12 от 14 декабря 2008 г., протокол № 85 от 27 мая 2020 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие. Получение биологического материала (кровь) произведено с учетом положений Хельсинской декларации ВМА (2013 г.), протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999) и дополнительного протокола к Конвенции по правам человека и биомедицине в области биомедицинских исследований (2005).

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Александровна Радаева  
ул. Ульянова, д. 26а, г. Саранск, 430032, Россия; radaevamed@mail.ru

**Статья получена:** 29.11.2023 **Статья принята к печати:** 14.12.2023 **Опубликована онлайн:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.056

## ALTERED CIRCADIAN EXPRESSION OF CYTOKINES IN BLOOD OF PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION FOLLOWING COVID-19

Radaeva OA<sup>1</sup>✉, Simbirtsev AS<sup>2</sup>, Kostina YuA<sup>1</sup>, Iskandiarova MS<sup>1</sup>, Negodnova EV<sup>1</sup>, Mashnina SV<sup>1</sup>, Ereemeev VV<sup>1</sup>, Krasnoglazova KA<sup>1</sup>, Babushkin IO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Research Mordovia State University, Saransk, Russia

<sup>2</sup> State Research and Development Institute of High Purity Biologicals of the Federal Medical and Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia

In spite of a vast number of trials devoted to quantitative characteristics of the cytokine profile in patients with various diseases, no exact reference intervals are presented. It is just as important that there is a limited number of trials analyzing circadian rhythms of cytokine synthesis in patients with arterial hypertension. The purpose of the work was to analyze the characteristics of circadian rhythms of cytokines (IL18, IL18 BP, LIF, sLIFr, M-CSF, MCSFR) in patients with Grade II essential arterial hypertension, and to detect pathogenetically significant characteristics developed following Covid-19. Blood samples were taken at 7.00–8.00, 12.00–13.00, 19.00–20.00.00, 00.00–1.00 to determine the levels of IL18, IL18 BP, LIF, sLIFr, M-CSF, MCSFR in 18 patients (56 (95% CI (54–69) years) with essential arterial hypertension (EAH) within three days prior to and following Covid-19. For this, the immunoenzyme method was used. The obtained data demonstrated altered circadian expression of cytokines in the peripheral blood of patients with essential hypertension depending on whether they have EAH or not, and their additional distortion following Covid-19, which is stable in the majority of cases. It is preserved for six months as low IL18 BP ( $p < 0,001$ ), and twofold increase of sLIFr and MCSF ( $p < 0,001$ ) at 18.00. A significant association is determined between the circadian rhythms of sLIFr and altered systolic BP resulting in the abnormal rhythm with BP rise at night (night peaker) in patients with EAH following COVID-19. The obtained fundamental data offer prospects for new research of immunopathogenesis following COVID-19 in patients with hypertension taking into account circadian rhythms of cytokines in the blood.

**Keywords:** essential hypertension, LIF, sLIFr, M-CSF, circadian rhythms

**Funding:** supported by the grant of the Russian Science Foundation 'Analysis of altered circadian expression of cytokines in blood of patients with essential hypertension as predictor of cardiovascular complications', № 23-25-00147.

**Author contribution:** Radaeva OA — trial design, analysis of results, preparation of a manuscript; Simbirtsev AS — stating the purpose of the trial, editing; Kostina YuA — lab research, preparation of a manuscript; Iskandiarova MS — working with literature, editing; Negodnova EV — working with literature, surveillance over patients; Mashnina SV, Krasnoglazova KA, Babushkin IO — statistical treatment of data; Ereemeev VV — editing.

**Compliance with ethical standards:** The trial was approved by the Ethics Committee of the National Research Mordovia State University (protocol № 12 as of December 14, 2008, protocol № 85 as of May 27, 2020). All patients signed a voluntary informed consent form. Biological sample (blood) was obtained in accordance with the provisions of Declaration of Helsinki of BMA (2013), protocol of Council of Europe Convention for the Protection of Human Rights and Biomedicine (1999) and additional protocol to Convention for the Protection of Human Rights and Biomedicine in the area of biomedical research (2005).

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga A. Radaeva  
Ulyanova, d. 26a, Saransk, 430032, Russia; radaevamed@mail.ru

**Received:** 29.11.2023 **Accepted:** 14.12.2023 **Published online:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.056

Исследования, посвященные изучению роли цитокинов в аспекте особенностей постковидного периода, актуальны, так как в период пандемии получен большой объем знаний об изменении этого звена иммунного регулирования при COVID-19, и восстановление происходит длительно, включая как ранний, так и поздний период реконвалесценции. При этом вирус-опосредованные изменения цитокинового звена, в связи с их полиорганными эффектами действия, в постковидном периоде могут определять модификацию патогенеза заболеваний неинфекционной природы, в том числе у больных с эссенциальной артериальной гипертензией (ЭАГ). Важно отметить, что, несмотря на большое число исследований, посвященных количественным характеристикам цитокинового профиля пациентов с различными заболеваниями, нет точных референсных интервалов. Не менее важно, что ограничено число исследований, анализирующих циркадианные ритмы синтеза цитокинов у лиц с определенными заболеваниями. Вышеперечисленное наиболее значимо для пациентов с ЭАГ, так как суточные кривые уровней АД имеют принципиальное значение и их уже давно учитывают на практике. В постковидном периоде описано как повышение частоты сердечно-сосудистых осложнений, так и развитие метаболического синдрома, что может быть связано и с методами терапии (широкое применение кортикостероидов), и с ролью коронавируса в зависимости от предсуществующих иммунопатогенетических и клинических характеристик больных. Уровни синтеза цитокинов не только выступают факторами, подчиняющимися суточным закономерностям, но и при клиническом или субклиническом дисбалансе способны влиять на главный центр циркадианных часов — супрахиазматическое ядро в головном мозге, а также способствовать потере синхронизации между

главным центром и периферическими «часами» [1, 2]. Хронобиология перспективна, обладает большим объемом значимых научных данных [3, 4] и требует расширения числа исследований в постковидном периоде. Важно отметить, что индивидуальный анализ суточных кривых содержания цитокинов в периферической крови позволяет говорить о более сложных закономерностях, чем двухфазные изменения день–ночь. По некоторым данным, количество IL2 в сыворотке крови образует единый пик примерно в полдень, а IL10, TNF и GM-CSF демонстрируют двухфазный паттерн [5]. У испытуемых первый пик TNF приходился на 07:30, а второй — на 13:30, что не позволяет однозначно относить его к группе цитокинов покоя. Уровни IL10 также демонстрировали двухфазную картину с одним пиком в 07:30 и вторым — 12 ч спустя — в 19:30. Эти результаты показывают, что временные паттерны уникальны для каждого цитокина, как правило, с дневными максимумами и ночными минимумами [2], в связи с чем фундаментальные данные об изменении циркадианных ритмов синтеза цитокинов после перенесенной новой коронавирусной инфекции могут представлять не только научный, но практический интерес в будущем.

Цель исследования — проанализировать особенности циркадианных ритмов содержания цитокинов (IL18, IL18 BP, LIF, sLIFr, M-CSF, MCSFR) в крови пациентов с ЭАГ II стадии и выделить патогенетически значимые особенности, сформированные после перенесенной новой коронавирусной инфекции.

#### ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполняли в 2019–2023 гг. на базах кафедры иммунологии, микробиологии, вирусологии Медицинского

Таблица 1. Анализ содержания цитокинов в крови у пациентов с ЭАГ до COVID-19

Временной интервал		7.00–8.00	12.00–13.00	19.00–20.00	0.00–1.00
		1	2	3	4
IL18, пг/мл	1-е сутки	356 [271–460]	402 [258–437]	523 [391–639]*1,2	610 [489–720]*1,2,3
	2-е сутки	317 [286–451]	398 [310–469]	551 [406–668]*1,2	689 [464–783]*1,2,3
	3-е сутки	368 [239–490]	417 [267–452]	584 [390–627]*1,2	621 [429–718]*1,2,3
IL18 BP, пг/мл	1-е сутки	6100 [3800–6900]	6300 [4100–7200]	5900 [3700–6800]	5500 [3500–6400]
	2-е сутки	5790 [3240–6450]	6100 [4320–7400]	6400 [4300–7100]	5800 [3200–6700]
	3-е сутки	5900 [3400–6600]	5800 [4200–6700]	6200 [4500–6900]	5700 [3500–6900]
LIF, пг/мл	1-е сутки	7,48 [4,21–10,1,3]	7,64 [4,37–11,5]	12,3 [8,25–14,1]*1,2	10,1 [9,88–11,9]^1,2,3
	2-е сутки	7,33 [4,18–12,1]	7,42 [3,91–11,9]	12,6 [8,12–14,3]*1,2	9,97 [10,2–12,2]^1,2,3
	3-е сутки	7,54 [4,12–11,8]	7,48 [4,11–12,5]	12,7 [7,96–14,4]*1,2	10,2 [9,97–12,5]^1,2,3
sLIFr, пг/мл	1-е сутки	3850 [2600–5100]	4100 [3600–4900]	5400 [4500–7300]*1,2	2900 [2300–3800]*1,2,3
	2-е сутки	3910 [2770–5300]	3870 [3540–5200]	5640 [4800–7200]*1,2	3100 [2500–4200]*1,2,3
	3-е сутки	3960 [2650–5250]	3840 [3590–5300]	5700 [4900–7400]*1,2	3720 [2400–4100]*1,2,3
M-CSF, пг/мл	1-е сутки	371 [308–493]	410 [290–482]	419 [327–494]*1^2	395 [315–526]
	2-е сутки	350 [292–471]	421 [287–475]	415 [347–484]*1^2	405 [321–519]
	3-е сутки	363 [315–488]	442 [293–490]	426 [351–492]*1^2	398 [309–524]
IL34, пг/мл	1-е сутки	127 [96,7–152]	144 [102–168]	93,6 [81,2–105]*2	80,2 [68,1–85,5]*1,2,3
	2-е сутки	118 [90,8–141]	136 [96–153]	98,5 [85,6–117]*2	81,9 [66,2–87,7]*1,2,3
	3-е сутки	131 [101,1–159]	148 [108–172]	101,7 [90,1–120]*2	92,7 [69,3–90,5]*1,2,3
MCSFR, мкг/мл	1-е сутки	22,8 [17,4–28,3]	18,7 [12,2–31,1]	20,6 [12,5–35,7]	19,9 [17,9–31,2]
	2-е сутки	24,4 [18,1–29,8]	19,3 [13,7–32,6]	23,2 [13,9–38,5]	26,2 [19,7–33,3]
	3-е сутки	23,6 [17,8–27,7]	17,5 [12,8–31,9]	22,5 [13,1–37,2]	21,7 [18,5–32,7]

Примечание: \* — уровень достоверности  $p < 0,001$ , ^ —  $p < 0,01$ , ' —  $p < 0,05$  (применяли критерий Уилкоксона для связанных совокупностей и критерий Манна–Уитни для несвязанных совокупностей) с указанием временных промежутков (1–7:00; 2–12:00; 3–19:00; 4–00:00).

Таблица 2. Анализ содержания цитокинов в крови у здоровых лиц до COVID-19

Временной интервал		7.00–8.00	12.00–13.00	19.00–20.00	0.00–1.00
		1	2	3	4
IL18, пг/мл	1-е сутки	185 [143–201]	164 [138–194]	214 [144–229]	301 [246–385]*1,2,3
	2-е сутки	178 [135–194]	157 [127–183]	196 [124–205]	289 [235–369]*1,2,3
	3-е сутки	190 [148–210]	171 [145–201]	220 [151–235]	314 [253–390]*1,2,3
IL18 BP, пг/мл	1-е сутки	4720 [4210–5110]	4830 [4160–5200]	4660 [4320–5170]	6100 [5720–6930]*1,2,3
	2-е сутки	4810 [4320–5230]	4920 [4210–5350]	4730 [4460–5250]	6450 [5840–7010]*1,2,3
	3-е сутки	4780 [4270–5160]	4870 [4190–5280]	4690 [4410–5190]	6320 [5800–7000]*1,2,3
LIF, пг/мл	1-е сутки	1,38 [1,15–1,68]	1,47 [1,31–1,73]	1,33 [1,26–1,75]	1,35 [1,24–1,63]
	2-е сутки	1,40 [1,17–1,71]	1,51 [1,35–1,77]	1,35 [1,29–1,78]	1,37 [1,27–1,66]
	3-е сутки	1,41 [1,19–1,75]	1,54 [1,40–1,81]	1,37 [1,31–1,82]	1,41 [1,30–1,69]
sLIFr, пг/мл	1-е сутки	3920 [3130–4870]	4260 [3450–4610]	4440 [3610–4830]	4160 [3780–4520]
	2-е сутки	3870 [3070–4790]	4990 [3390–4650]	4380 [3580–4770]	4130 [3690–4430]
	3-е сутки	4010 [3210–4980]	5180 [3520–4700]	4530 [3720–4950]	4240 [3870–4610]
M-CSF, пг/мл	1-е сутки	220 [143–283]	187 [137–240]	235 [138–281]	357 [315–394]*1,2,3
	2-е сутки	237 [160–299]	198 [149–243]	253 [155–310]	369 [328–404]*1,2,3
	3-е сутки	228 [151–295]	191 [142–239]	244 [147–293]	361 [321–398]*1,2,3
IL34, пг/мл	1-е сутки	162 [112–203]	170 [126–212]	169 [147–235]*2	158 [127–216]
	2-е сутки	158 [107–196]	167 [122–208]	165 [141–233]*2	155 [121–210]
	3-е сутки	165 [116–210]	174 [131–218]	172 [150–239]*2	163 [133–215]
MCSFR, мкг/мл	1-е сутки	31,6 [25,7–39,2]	27,9 [19,3–37,1]	44,7 [32,1–49,8]*2,3	67,7 [42,1–93,6]*1,2,3
	2-е сутки	28,9 [23,5–38,7]	26,5 [18,2–35,3]	41,9 [29,9–48,3]*2,3	63,6 [38,8–89,7]*1,2,3
	3-е сутки	32,1 [26,3–40,1]	28,6 [20,4–39,2]	45,3 [33,7–50,6]*2,3	69,5 [44,6–96,3]*1,2,3

Примечание: \* — уровень достоверности  $p < 0,001$ , ^ —  $p < 0,01$ , ' —  $p < 0,05$  (применяли критерий Уилкоксона для связанных совокупностей и критерий Манна–Уитни для несвязанных совокупностей) с указанием временных промежутков (1 — 7:00; 2 — 12:00; 3 — 19:00; 4 — 00:00).

института ФГБОУ ВО «НИ МГУ им. Н. П. Огарева» (микробиологическая и иммунологическая лаборатория — лицензия № 13.01.04. 0001. Л.000005.06.11, бессрочная), ГБУЗ РМ «РКБ имени С. В. Каткова», ФГБУ «Санаторно-курортный комплекс «Северокавказский» МО РФ.

Под динамическим комплексным (клиническим, лабораторно-инструментальным) наблюдением находились 27 больных (10 женщин и 17 мужчин) с ЭАГ II стадии (группа 1) и 16 здоровых лиц (7 женщин и 9 мужчин) с нормальным уровнем АД (группа 2), у которых в 2019 г. (до пандемии) были проанализированы уровни цитокинов (7.00–8.00 ч, 12.00–13.00 ч, 19.00–20.00, 00.00–1.00) в крови в течение трех суток. В 2020 г. (циркуляция штамма Wuhan-Hu-1) у 18 пациентов из первой группы (8 женщин и 10 мужчин) и у 9 человек (4 женщины и 5 мужчин) из второй группы был диагностирован COVID-19 в соответствии с актуальными временными методическими рекомендациями по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции, среднетяжелое течение, пневмония (КТ I–II ст). Применяли сопоставимые схемы терапии: дексаметазон — 16 мг/сут., сумамед 500 — 3 раза в день, гепарин (коллектив исследователей не влиял на терапию).

Критерии включения пациентов в исследование 2019 г.: ЭАГ II стадии, длительность заболевания — 10 лет (первый этап исследования), сопоставимая гипотензивная терапия (и-АПФ ± диуретик), 55–60 лет, уровень общего холестерина менее 5,0 ммоль/л, ЛПНП менее 3,0 ммоль/л, ЛПВП более 1,0 ммоль/л, ТГ менее 1,7 ммоль/л, ТИМ менее 0,9 мм, глюкоза менее 5,5 мг/дл, ИМТ менее 30 кг/м<sup>2</sup>, сопоставимые характеристики режима дня (сон с 23.00 до 6.00, последний прием пищи в 20.00, отсутствие нарушения сна и приема снотворных средств

и/или препаратов, содержащих мелатонин (оценку данных характеристик проводил врач-невролог), подписание пациентом информированного согласия.

Дополнительные критерии включения пациентов в 2020 г.: участие в исследовании циркадианных ритмов содержания цитокинов у больных с ЭАГ в 2019 г.; COVID-19 в анамнезе (10-й день после клинико-лабораторного выздоровления при сопоставимой длительности госпитализации 14–16 дней); в группу 2 — лица без ЭАГ + COVID-19 в анамнезе (10-й день после клинико-лабораторного выздоровления при сопоставимой длительности госпитализации 14–16 дней); COVID-19 подтвержден методом ПЦР и данными серологического исследования; среднетяжелое течение, с поражением легких (КТ I–II ст.); сопоставимая терапия COVID-19, а также наличие письменного согласия на обследование.

Критерии исключения были общими в 2019 и 2020 гг.: сахарный диабет 1-го или 2-го типа, заболевания аллергического/аутоиммунного характера, психические заболевания, симптоматическая АГ, курение, претенденты, не готовые к долгосрочному обследованию, применение противовирусных и иммуномодулирующих препаратов в период COVID-19 и за шесть месяцев до исследования. Исключали больных, которым необходим прием антигипертензивных препаратов, помимо ИАПФ и/или тиазидных/тиазидопобных диуретиков (только для группы с ЭАГ II стадии).

Время забора крови (7.00–8.00, 12.00–13.00, 19.00–20.00, 00.00–1.00) и спектр цитокинов (IL18, IL18 BP, LIF, sLIFr, M-CSF, MCSFR) были определены на основании научных исследований о циркадианных ритмах биологии цитокинов человека [6, 7] и ранее проведенных собственных исследований по изучению цитокинов в патогенезе ЭАГ [8].

Таблица 3. Анализ уровней цитокинов крови у пациентов с ЭАГ через 10 дней после перенесенной новой коронавирусной инфекции

Временной интервал		7.00–8.00	12.00–13.00	19.00–20.00	0.00–1.00
		1	2	3	4
IL18, пг/мл	1-е сутки	460 [396–510]	445 [368–474]	590 [453–670]	792 [373–821]*1,2,3
	2-е сутки	446 [370–482]	435 [352–459]	582 [442–649]	759 [338–803]*1,2,3
	3-е сутки	454 [387–503]	440 [361–467]	588 [447–658]	781 [352–811]*1,2,3
IL18 BP, пг/мл	1-е сутки	6300 [4110–7500]	6110 [3730–7460]	5100 [3700–6400]*1,2	5310 [3230–6370]*3
	2-е сутки	6150 [4030–7350]	5980 [3610–7320]	4820 [3550–6240]	4830 [3050–6180]
	3-е сутки	6220 [4090–7460]	6050 [3690–7380]	4950 [3630–6330]	4910 [3170–6250]
LIF, пг/мл	1-е сутки	7,69 [4,35–10,8]	7,92 [4,51–10,5]	13,1 [8,74–15,6]*1,2	9,83 [9,12–11,7]*3
	2-е сутки	7,33 [4,25–9,9]	7,63 [4,00–10,2]	12,6 [8,11–14,9]	9,10 [8,92–10,8]*3
	3-е сутки	7,51 [4,31–10,4]	7,88 [4,32–10,4]	12,9 [8,55–15,4]	9,58 [9,05–11,3]*3
sLIFr, пг/мл	1-е сутки	4100 [2720–5000]	3820 [2910–4500]	7900 [6200–8400]*1,2	3870 [3100–4200]*3
	2-е сутки	3850 [2680–4930]	3530 [2850–4320]	7590 [6030–7990]	3480 [2860–4080]
	3-е сутки	3980 [2700–4980]	3660 [2890–4470]	7770 [6120–8250]	3750 [2970–4110]
M-CSF, пг/мл	1-е сутки	630 [570–810]	593 [492–685]	830 [540–973]*1,2	601 [518–710]*3
	2-е сутки	605 [561–792]	561 [477–661]	812 [521–953]	582 [501–695]
	3-е сутки	616 [569–802]	582 [485–672]	826 [530–964]	593 [512–693]
MCSFR, мкг/мл	1-е сутки	9,18 [8,3–31,5]	10,23 [7,16–12,4]	10,5 [8,53–13,2]	9,51 [6,42–12,3]
	2-е сутки	9,05 [8,1–29,6]	9,81 [6,91–11,5]	9,93 [8,41–12,8]	9,11 [6,30–11,8]
	3-е сутки	9,10 [8,2–30,2]	10,12 [7,02–12,0]	10,4 [8,49–13,1]	9,26 [6,39–12,1]

Примечание: \* — уровень достоверности  $p < 0,001$ , ^ —  $p < 0,01$ , ' —  $p < 0,05$  (применяли критерий Уилкоксона для связанных совокупностей и критерий Манна-Уитни для несвязанных совокупностей) с указанием временных промежутков (1 — 7:00; 2 — 12:00; 3 — 19:00; 4 — 00:00).

По данным нашего 10-летнего исследования, уровни IL18, IL18 BP, LIF, sLIFr, M-CSF, MCSFR статистически независимо ассоциированы с частотой развития сердечно-сосудистых осложнений у больных с ЭАГ, что объясняют и данные о спектре клеток, обладающих рецепторами для этих цитокинов [9], и их связи с метаболизмом вазопрессоров и вазодилататоров.

Забор крови проводили в 7.00–8.00, 12.00–13.00, 18.00–19.00.00, 00.00–1.00 (трое суток) с использованием систем BD Vacutainer (Becton Dickinson; США (для выделения сыворотки крови), кровь центрифугировали (1500–2000 об./мин, 15 мин) для выделения сыворотки с последующим хранением сыворотки крови в маркированных пробирках при температуре  $-30^{\circ}\text{C}$  не более 30 суток. Время от забора крови до замораживания составляло 60 мин. Цитокины (IL18, IL18 BP, LIF, sLIFr, M-CSF, MCSFR) определял сертифицированный специалист методом ИФА на иммуноферментном анализаторе Personal Lab TM (Adaltis; Италия). Тест-системы фирм eBioscience (Bender MedSystems; Австрия), R&D Systems (США).

Суточные характеристики пациентов определены в соответствии с классификацией: снижение АД от 10 до 20% соответствует типу «Диппер»; снижение менее 10% — «Нон-диппер»; рост в ночное время — «Найт-пикер». Суточное мониторирование проводили всем пациентам параллельно с забором крови для определения уровней цитокинов.

Статистическую обработку полученных результатов провели с использованием программы StatTech v. 2.8.8 («Статтех»; Россия) и Stat Soft Statistica 10.0 (США). Результаты представлены в виде медианы (Me) и перцентилей (Q0,25–Q0,75). Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. При сравнении зависимых выборок использовали критерий Уилкоксона, независимых групп — критерий Манна-Уитни. Применяли регрессионную модель Кокса с оценкой

коэффициента регрессии. За статистически достоверные были приняты различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ данных динамики содержания изучаемых цитокинов в крови пациентов с ЭАГ в течение двух суток в допандемический период (табл. 1) позволил определить отличия от закономерностей здоровых лиц (табл. 2).

В системе IL18–IL18BP на фоне ЭАГ отмечено повышение с 19.00 и в 0.00 ч содержания в сыворотке периферической крови IL18 при сопоставлении с результатами, полученными в 7.00 и 12.00 ( $p < 0,001$ ) без роста IL18 BP в течение времени наблюдения. У здоровых лиц не зарегистрировано увеличение IL18, но было повышение IL18 BP ( $p < 0,05$ ) в 00.00. При этом количественно уровни IL18 у лиц с гипертензией достоверно превышают данные группы здоровых лиц ( $p < 0,001$ ). В период ранней реконвалесценции после перенесенной новой коронавирусной инфекции у пациентов с ЭАГ дополнительно зафиксировано снижение уровня IL18 BP в 19.00, которое сохранялось и в 00.00 ( $p < 0,001$ ) при сопоставлении с данными в 7.00, 13.00, 19.00 (табл. 3), что отличало данную группу от здоровых, имеющих повышение концентрации IL18 в 00.00, но при компенсаторном увеличении IL18 BP с 20.00 (табл. 4).

Анализ системы LIF-sLIFR до SARS-CoV-2 инфицирования выявил у лиц с ЭАГ рост двух компонентов системы в 19.00 со снижением в 00.00 (табл. 1), данная динамика отсутствовала у здоровых лиц (табл. 2). В период реконвалесценции после перенесенной новой коронавирусной инфекции у больных с ЭАГ обнаружено более выраженное (200%) увеличение sLIFr в 19.00, с сохранением динамики и количественных характеристик LIF.

Уровни M-CSF, а также его рецептора у лиц с ЭАГ не изменялись в течение суток в доковидном периоде (табл. 1), при этом у здоровых лиц отмечен рост в 00.00

Таблица 4. Анализ уровней цитокинов крови у пациентов без ЭАГ через 10 дней после перенесенной новой коронавирусной инфекции

Временной интервал		7.00–8.00	12.00–13.00	19.00–20.00	0.00–1.00
		1	2	3	4
IL18, пг/мл	1-е сутки	151 [144–203]	158 [129–214]	169 [136–223]	291 [247–383]*1,2,3
	2-е сутки	138 [133–196]	141 [120–203]	161 [128–215]	273 [233–375]*1,2,3
	3-е сутки	145 [139–201]	149 [125–211]	165 [131–220]	282 [242–379]*1,2,3
IL18 BP, пг/мл	1-е сутки	4670 [4170–5120]	4590 [4210–5310]	6400 [5370–7510]*1,2	6100 [5330–7820]*1,2,3
	2-е сутки	4320 [3890–5010]	4250 [4030–5100]	6050 [5150–7270]*1,2	5880 [5140–6510]*1,2,3
	3-е сутки	4590 [3960–5090]	4420 [4110–5230]	6230 [5230–7440]*1,2	6010 [5220–6680]*1,2,3
LIF, пг/мл	1-е сутки	1,39 [1,12–1,64]	1,47 [1,24–1,72]	1,36 [1,05–1,55]	1,36 [1,21–1,7]
	2-е сутки	1,25 [1,09–1,54]	1,38 [1,21–1,68]	1,33 [0,98–1,43]	1,34 [1,15–1,63]
	3-е сутки	1,32 [1,11–1,61]	1,41 [1,22–1,70]	1,28 [0,91–1,20]	1,31 [1,08–1,56]
sLIFr, пг/мл	1-е сутки	4120 [3620–4510]	3960 [3310–4580]	4210 [3640–4660]	4170 [3580–4790]
	2-е сутки	4030 [3430–4360]	3650 [3050–4270]	4090 [3400–4530]	3960 [3410–4530]
	3-е сутки	4090 [3580–4420]	3820 [3220–4390]	4130 [3550–4610]	4080 [3490–4670]
M-CSF, пг/мл	1-е сутки	190 [138–236]	171 [139–247]	182 [121–268]	333 [287–412]*1,2,3
	2-е сутки	175 [129–227]	160 [121–236]	171 [115–253]	292 [263–393]*1,2,3
	3-е сутки	183 [131–230]	169 [128–241]	179 [119–261]	314 [275–403]*1,2,3
IL34, пг/мл	1-е сутки	146 [121–198]	152 [127–231]	221 [169–262]*1,2	155 [127–193]*3
	2-е сутки	131 [115–179]	135 [113–219]	203 [153–248]*1,2	138 [115–174]*3
	3-е сутки	142 [119–183]	148 [121–227]	217 [161–254]*1,2	144 [123–188]*3
MCSFR, мкг/мл	1-е сутки	31,6 [24,3–39,7]	29,6 [21,2–36,5]	51,9 [34,2–58,8]*2,3	66,2 [38,5–101,3]*1,2,3
	2-е сутки	27,6 [21,7–35,3]	26,8 [19,8–33,7]	48,3 [31,8–52,3]*2,3	59,1 [33,2–97,5]*1,2,3
	3-е сутки	29,4 [23,8–38,2]	28,3 [20,9–35,9]	50,2 [33,4–55,7]*2,3	63,5 [35,9–99,7]*1,2,3

Примечание: \* — уровень достоверности  $p < 0,001$ , ^ —  $p < 0,01$ , ' —  $p < 0,05$  (применяли критерий Уилкоксона для связанных совокупностей и критерий Манна-Уитни для несвязанных совокупностей) с указанием временных промежутков (1 — 7:00; 2 — 12:00; 3 — 19:00; 4 — 00:00).

M-CSF на фоне увеличения M-CSFR в 19.00 и 00.00 с восстановлением в 7.00. Количественные характеристики M-CSF были достоверно выше у пациентов с гипертензией во все временные промежутки ( $p < 0,001$ ) при сопоставлении с данными здоровых лиц. В период реконвалесценции после COVID-19 отмечено формирование пикового увеличения M-CSF в 19.00 со снижением в 00.00 у лиц с ЭАГ (не выявлено ранее) без динамики M-CSFR. У здоровых лиц отсутствуют изменения циркадианных ритмов данных цитокинов при сопоставлении с данными до SARS-CoV-2 инфицирования.

Важно отметить, что через шесть месяцев после перенесенного COVID-19 при мониторинге аналогичных цитокинов у 85% пациентов с ЭАГ закрепились циркадианные закономерности, сформированные после COVID-19 в виде снижения в 19.00 содержания IL18 BP, двукратного увеличения sLIFr и MCSF (табл. 5), а у здоровых лиц обнаружено восстановление закономерностей доковидного периода (табл. 6).

Сопоставление особенностей циркадианных ритмов содержания анализируемых цитокинов в постковидном периоде и изменения течения ЭАГ позволили выявить (в ходе проведенного интраквартального анализа), что для пациентов при увеличении уровня sLIFr на 200% и более (III и IV квантили изменения уровня sLIFr — 8 человек) в 19.00 характерен вечерний рост систолического артериального давления выше 150 мм рт. ст., несмотря на антигипертензивную терапию, дающую терапевтический эффект до перенесенной новой коронавирусной терапии и в утреннее/дневное время после перенесенной инфекции, что потребовало изменения терапии (времени приема препарата) и увеличения дозы базовых препаратов. К тому же в постковидном периоде у 8 из 18 пациентов с ЭАГ,

включенных в исследование, сформировался суточный ритм АД по результатам холтеровского мониторирования — «Найт-пикер» (повышение АД в ночное время), до SARS-CoV-2-инфицирования все пациенты относились к группе Dipper. Указанные пациенты имели совокупность изменений циркадианных ритмов, описанную выше: снижение содержания IL18 BP более 58%, двукратное увеличение sLIFr и MCSF. При этом многофакторный корреляционный анализ связи уровней цитокинов (IL18, IL18 BP, LIF, sLIFr, M-CSF, MCSFR) во всех анализируемых временных точках и уровня систолического артериального давления (по данным суточного мониторирования АД) выявил достоверную статистически независимую связь между концентрацией sLIFr и систолическим АД: коэффициент регрессии — 2,48, стандартная ошибка — 0,22,  $t$ -критерий — 9,83, относительный риск повышения систолического АД в период после 18.00 — 4,2, критерий Уальди — 16,3.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные демонстрируют изменения циркадианных ритмов содержания цитокинов в периферической крови у пациентов и в зависимости от наличия ЭАГ, и их дополнительное искажение в постковидном периоде, что в значимом числе случаев имеет стойкий характер с сохранением более шести месяцев. Учитывая ранее опубликованные данные о корреляционных связях увеличения sLIFr более 5000 пг/мл с ростом NT-proBNP ( $r = 0,87$ ;  $p = 0,0007$ ), а MCSF с уровнем в крови SDMA ( $r = 0,83$ ;  $p = 0,0008$ ) [7], можно говорить о патогенетической значимости выявленных циркадианных изменений в аспекте прогрессирования ЭАГ. Так, вторичный рост NT-proBNP, несмотря на способность к вазодилатации, что

Таблица 5. Анализ уровней цитокинов крови у пациенты с ЭАГ через 6 месяцев после перенесенной новой коронавирусной инфекции

Временной интервал		7.00–8.00	12.00–13.00	19.00–20.00	0.00–1.00	7.00–8.00
		1	2	3	4	5
IL18, пг/мл	1-е сутки	457 [388–514]	449 [374–493]	589 [431–661]	791 [370–818]*1,2,3	461 [369–505]
IL18 BP, пг/мл	1-е сутки	6280 [4100–7490]	6070 [3670–7350]	5210 [3280–6500]*1,2	5380 [3510–6400]*3	6220 [4010–7090]
LIF, пг/мл	1-е сутки	7,26 [4,03–9,9]	7,88 [4,19–10,7]	12,9 [7,81–16,1]*1,2	10,1 [8,12–12,3]*3	7,31 [4,15–10,1]
sLIFr, пг/мл	1-е сутки	4020 [2510–5100]	3790 [2880–4430]	7870 [6150–8390]*1,2	3690 [3110–4180]*3	3990 [2490–5020]
M-CSF, пг/мл	1-е сутки	621 [554–816]	588 [461–625]	815 [593–954]*1,2	650 [521–733]*3	618 [560–831]
MCSFR, мкг/мл	1-е сутки	9,04 [7,3–13,5]	11,12 [6,76–13,1]	11,3 [8,41–13,9]	9,42 [7,12–13,1]	8,95 [6,81–12,8]

Примечание: \* — уровень достоверности  $p < 0,001$ , ^ —  $p < 0,01$ , ' —  $p < 0,05$  (применяли критерий Уилкоксона для связанных совокупностей и критерий Манна–Уитни для несвязанных совокупностей) с указанием временных промежутков (1 — 7:00; 2 — 12:00; 3 — 19:00; 4 — 00:00).

Таблица 6. Анализ уровней цитокинов крови у пациентов без ЭАГ через 6 месяцев после перенесенной новой коронавирусной инфекции

Временной интервал		7.00–8.00	12.00–13.00	19.00–20.00	0.00–1.00	7.00–8.00
		1	2	3	4	5
IL18, пг/мл	1-е сутки	143 [138–193]	151 [126–210]	163 [128–264]	273 [232–357]*1,2,3	154 [129–201]
IL18 BP, пг/мл	1-е сутки	4530 [4030–4990]	4490[4010–5170]	6340 [4970–6960]*1,2	5990 [5330–7340]*1,2,3	4710 [3980–4920]
LIF, пг/мл	1-е сутки	1,31[1,05–1,44]	1,39 [1,13–1,55]	1,29 [0,98–1,45]	1,32 [1,19–1,68]	1,33 [1,01–1,38]
sLIFr, пг/мл	1-е сутки	4060 [3490–4330]	3830 [3110–4270]	4100 [3340–4220]	4160 [3390–4580]	4020 [3530–4290]
M-CSF, пг/мл	1-е сутки	179 [128–216]	168[123–221]	181 [118–246]	311 [269–403]*1,2,3	184 [131–226]
IL34, пг/мл	1-е сутки	139 [110–173]	154 [129–242]	218[159–258]*1,2	144 [107–173]*3	140 [114–185]
MCSFR, мкг/мл	1-е сутки	28,7 [23,8–37,7]	29,1 [20,3–36,4]	52,2 [35,7–60,1]*2,3	64,9 [36,5–110,1]*1,2,3	30,1 [21,4–32,9]

Примечание: \* — уровень достоверности  $p < 0,001$ , ^ —  $p < 0,01$ , ' —  $p < 0,05$  (применяли критерий Уилкоксона для связанных совокупностей и критерий Манна–Уитни для несвязанных совокупностей) с указанием временных промежутков (1 — 7:00; 2 — 12:00; 3 — 19:00; 4 — 00:00).

позитивно при ЭАГ, будет определять прогрессирование хронической сердечной недостаточности с повышением риска формирования сердечно-сосудистых осложнений [10]. Положительная связь MCSF и IL18 с ростом SDMA [8] чаще имеет ренальный характер [11] и может определять вектор прогрессирования гипертензии, отменяя эссенциальный характер. Но есть данные о его продукции эндотелиальными клетками под воздействием провоспалительных цитокинов [12], что в данном случае может носить вирус-индуцированный характер.

Фундаментальные исследования, посвященные циркадианным ритмам синтеза тех или иных регуляторных пептидов, требуют высокой сопоставимости включенных в исследование пациентов (что было достигнуто в исследовании и позволило сократить объем выборки), а также стабильности суточных ритмов жизни, чередования фаз день/ночь, и имеют больше теоретическое значение. Однако в анализируемых клинических ситуациях выявлены значимые связи, определяющие и клинические особенности развития гипертензии с изменением схем терапии из-за потери контроля над уровнем АД при изменении его суточного ритма, который был достигнут до инфицирования SARS-CoV-2.

Отдельное внимание необходимо уделить отсутствию компенсаторного увеличения у лиц с ЭАГ в постковидном периоде цитокинов, обладающих протективными свойствами в отношении прогрессирования эндотелиальной дисфункции (IL18 BP, M-CSFR). IL18-BP снижает риск повреждения почек на моделях ишемии–реперфузии на животных благодаря своей антиоксидантной и противовоспалительной активности, а

также антиапоптотическим свойствам [13], что значимо при АГ. В ряде публикаций при этом отмечена перспективность IL18 BP как терапевтической мишени при сердечно-сосудистых заболеваниях [13, 14].

При детальном анализе подтверждаются данные о необходимости оценки четырех временных точек; наибольшая прогностическая значимость для анализируемых цитокинов определена в 19.00. Это значимо для дальнейших смежных исследований, которые изучают роль цитокинов в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и постковидного синдрома, но ориентируются на утренний забор крови, возможно, менее значимый, чем в 19.00.

## Выводы

Анализ роли инфицирования вирусом SARS-CoV-2 в изменении циркадианных ритмов содержания цитокинов (IL18, IL18 BP, LIF, sLIFr, M-CSF, MCSFR) в крови у лиц с ЭАГ открывает перспективы анализа роли и других инфекционных агентов в изменении цитокинового компонента прогрессирования эндотелиальной дисфункции. Сделана оценка изменения уровня цитокинов в нескольких временных точках в течение суток с верификацией повторения выявленных закономерностей при наблюдении пациента в течение нескольких дней. Хронобиология требует многостороннего изучения для расширения объема фундаментальных данных, которые способны объяснить клинические особенности социально-значимых заболеваний и в будущем, возможно, станут основой новых принципов терапии.

## Литература

- Richards J, Gumz ML. Mechanism of the circadian clock in physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013; 304 (12): 1053–64. DOI: 10.1152/ajpregu.00066.2013.
- Jin RR, Cheung CN, Wong CHY, Lo CCW, Lee CPI, Tsang HW, et al. Sleep quality mediates the relationship between systemic inflammation and neurocognitive performance. *Brain Behav Immun Health*. 2023; 30: 365–74. DOI: 10.1016/j.bbih.2023.100634.
- Катинас Г. С., Чибисов С. М., Халаби Г. М., Деметьев М. В. Аналитическая хронобиология. М.: Бейрут, 2017; 224 с.
- Чибисова С. М., Рапопорт С. И., Благодрава М. Л. Хронобиология и хрономедицина. М.: Изд-во РУДН, 2018; 828 с.
- Young MR, Matthews JP, Kanabrocki EL, Sothorn RB, Roitman-Johnson B, Scheving LE. Circadian rhythmometry of serum interleukin-2, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in men. *Chronobiol Int*. 1995; 12 (1): 19–27. DOI: 10.3109/07420529509064496.
- Scheiermann C, Gibbs J, Ince L, Loudon A. Clocking in to immunity. *Nat Rev Immunol*. 2018; 18 (7): 423–37. DOI: 10.1038/s41577-018-0008-4.
- Geiger SS, Fagundes CT, Siegel RM. Chrono-immunology: progress and challenges in understanding links between the circadian and immune systems. *Immunology*. 2015; 146 (3): 349–58. DOI: 10.1111/imm.12525.
- Радаева О. А., Симбирцев А. С. Цитокины в иммунопатогенезе артериальной гипертензии. М.: Наука, 2021; 350 с.
- The Human Protein Atlas project is funded by the Knut & Alice Wallenberg foundation. 2023 [25.11.2023]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/>.
- Daya NR, McEvoy JW, Christenson RH, Tang O, Foti K, Juraschek SP, et al. Prevalence of Elevated NT-proBNP and its Prognostic Value by Blood Pressure Treatment and Control. *Am J Hypertens*. 2023; 36 (11): 602–11. DOI: 10.1093/ajh/hpad065.
- Dahlem DP, Neiger R, Schweighauser A, Francey T, Yerramilli M, Obare E, et al. Plasma Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs with Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med*. 2017; 31 (3): 799–804. DOI: 10.1111/jvim.14694.
- Chen S, Martens-Lobenhoffer J, Weissenborn K, Kielstein JT, Lichtinghagen R, Deb-Chatterji M, et al. Correction: Association of dimethylarginines and mediators of inflammation after acute ischemic stroke. *J Neuroinflammation*. 2023; 20 (1): 103. DOI: 10.1186/s12974-023-02775-0.
- Nakanishi Y, Horimasu Y, Yamaguchi K, Sakamoto S, Masuda T, Nakashima T, et al. IL18 binding protein can be a prognostic biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2021; 16 (6): 252–64. DOI: 10.1371/journal.pone.0252594.
- Ain QU, Dewi TI, Kurniati NF. Plasma Levels of Interleukin-6 and -18 Significantly Increase in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Oman Med J*. 2023; 38 (4): 529–32. DOI: 10.5001/omj.2023.94.

## References

- Richards J, Gumz ML. Mechanism of the circadian clock in physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013; 304 (12): 1053–64. DOI: 10.1152/ajpregu.00066.2013.
- Jin RR, Cheung CN, Wong CHY, Lo CCW, Lee CPI, Tsang HW, et al. Sleep quality mediates the relationship between systemic inflammation and neurocognitive performance. *Brain Behav Immun Health*. 2023; 30: 365–74. DOI: 10.1016/j.bbih.2023.100634.
- Katinas GS, Chibisov SM, Halabi GM, Dementev MV. Analiticheskaja hronobiologija. M.: Bejrut, 2017; 224 s. Russian.
- Chibisova SM, Rapoport SI, Blagoravova ML. Hronobiologija i hronomedicina. M.: Izd-vo RUDN, 2018; 828 s. Russian.
- Young MR, Matthews JP, Kanabrocki EL, Sothorn RB, Roitman-Johnson B, Scheving LE. Circadian rhythmometry of serum interleukin-2, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in men. *Chronobiol Int*. 1995; 12 (1): 19–27. DOI: 10.3109/07420529509064496.
- Scheiermann C, Gibbs J, Ince L, Loudon A. Clocking in to immunity. *Nat Rev Immunol*. 2018; 18 (7): 423–37. DOI: 10.1038/s41577-018-0008-4.
- Geiger SS, Fagundes CT, Siegel RM. Chrono-immunology: progress and challenges in understanding links between the circadian and immune systems. *Immunology*. 2015; 146 (3): 349–58. DOI: 10.1111/imm.12525.
- Radaeva OA, Simbircev AS. Citokiny v immunopatogeneze arterial'noj gipertenzii. M.: Nauka, 2021; 350 s. Russian.
- The Human Protein Atlas project is funded by the Knut & Alice Wallenberg foundation. 2023 [25.11.2023]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/>.
- Daya NR, McEvoy JW, Christenson RH, Tang O, Foti K, Juraschek SP, et al. Prevalence of Elevated NT-proBNP and its Prognostic Value by Blood Pressure Treatment and Control. *Am J Hypertens*. 2023; 36 (11): 602–11. DOI: 10.1093/ajh/hpad065.
- Dahlem DP, Neiger R, Schweighauser A, Francey T, Yerramilli M, Obare E, et al. Plasma Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs with Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med*. 2017; 31 (3): 799–804. DOI: 10.1111/jvim.14694.
- Chen S, Martens-Lobenhoffer J, Weissenborn K, Kielstein JT, Lichtinghagen R, Deb-Chatterji M, et al. Correction: Association of dimethylarginines and mediators of inflammation after acute ischemic stroke. *J Neuroinflammation*. 2023; 20 (1): 103. DOI: 10.1186/s12974-023-02775-0.
- Nakanishi Y, Horimasu Y, Yamaguchi K, Sakamoto S, Masuda T, Nakashima T, et al. IL18 binding protein can be a prognostic biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2021; 16 (6): 252–64. DOI: 10.1371/journal.pone.0252594.
- Ain QU, Dewi TI, Kurniati NF. Plasma Levels of Interleukin-6 and -18 Significantly Increase in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Oman Med J*. 2023; 38 (4): 529–32. DOI: 10.5001/omj.2023.94.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОСТАВА ГЕНОВ АНТИМИКРОБНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В ГЕНОМАХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *CORYNEBACTERIUM*

Т. А. Кульшань <sup>✉</sup>, И. О. Бугаева, Е. Ф. Соболева, М. С. Аллянова, Д. А. Попов, И. Г. Швиденко

Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, Россия

В настоящее время множественная антимикробная резистентность бактериальных инфекционных агентов представляет серьезную угрозу для мирового здравоохранения. Особое значение в развитии инфекций, в том числе госпитальных, играют следующие виды коринебактерий: *C. amycolatum*, *C. urealyticum*, *C. striatum*, *C. jeikeium*, *C. aurimucosum*, *C. genitalium*, которые устойчивы к большому арсеналу антимикробных препаратов. Целью исследования было проведение биоинформатического анализа спектра генов устойчивости к антимикробным препаратам в опубликованных геномах некоторых представителей рода *Corynebacterium*. Исследованы данные о нуклеотидных последовательностях полных геномов 22 штаммов коринебактерий, представленных в свободном доступе в NCBI GenBank. Биоинформатический анализ полногеномных последовательностей с целью поиска генов антимикробной устойчивости в указанных геномах осуществляли с помощью онлайн-ресурса PATRIC. Установлено, что представленные геномы в различных комбинациях содержали 25 генов устойчивости к антимикробным препаратам. У некоторых штаммов коринебактерий выявлены аминокислотные замены в *GyrA* (позиции 87, 88 и 91), с которыми может быть связана реализация устойчивости к хинолонам/фторхинолонам.

**Ключевые слова:** *C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. striatum*, *C. urealyticum*, *C. aurimucosum*, геномы, гены антимикробной устойчивости, *gyrA*, антимикробные (противомикробные) препараты

**Вклад авторов:** Т. А. Кульшань — планирование исследования, анализ литературы, работа с молекулярно-генетическими данными (подбор геномов, аннотация генома, сравнительный анализ аминокислотной последовательности гена *gyrA*), аналитическая работа с полученными данными, написание публикации; И. О. Бугаева — планирование исследования, аналитическая работа с полученными данными, интерпретирование результатов, участие в написании публикации; Е. Ф. Соболева — анализ литературы, аналитическая работа с полученными данными, написание публикации; М. С. Аллянова — анализ литературы, анализ состава генов антимикробной устойчивости в геномах штаммов коринебактерий, работа с онлайн-сервисом PATRIC; Д. А. Попов — анализ литературы, поиск аминокислотных последовательностей гена *gyrA* в геномах коринебактерий, сравнительный анализ аминокислотных последовательностей; И. Г. Швиденко — консультирование в ходе написания статьи, аналитическая работа с полученными данными.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Алексеевна Кульшань  
ул. Б. Казачья, д. 112, г. Саратов, 410012, Россия; tatjana.kulshan@yandex.ru

**Статья получена:** 20.10.2023 **Статья принята к печати:** 03.12.2023 **Опубликована онлайн:** 19.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.047

## COMPARATIVE BIOINFORMATICS ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENE POOL IN THE GENOMES OF REPRESENTATIVES OF GENUS *CORYNEBACTERIUM*

Kulshan TA <sup>✉</sup>, Bugaeva IO, Soboleva EF, Allyanova MS, Popov DA, Shvidenko IG

Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, Russia

Currently, multidrug resistance of bacterial infectious agents poses a serious threat to the global public health. The following *Corynebacterium* strains are of special importance for infections, including hospital-acquired ones: *C. amycolatum*, *C. urealyticum*, *C. striatum*, *C. jeikeium*, *C. aurimucosum*, *C. genitalium* that are resistant to the broad spectrum of antimicrobial drugs. The study was aimed to conduct bioinformatics analysis of the pool of antimicrobial resistance genes in the published genomes of some members of the genus *Corynebacterium*. The data on the whole genome nucleotide sequences of 22 *Corynebacterium* isolates readily available from NCBI GenBank were assessed. Bioinformatics analysis of the whole genome sequences conducted in order to search for antimicrobial resistance genes in the specified genomes was performed using the PATRIC online resource. It was found that the genomes provided comprised various combinations of 25 antimicrobial drug resistance genes. Amino acid substitutions in *GyrA* (positions 87, 88 and 91) were revealed in some *Corynebacterium* strains, through which quinolone/fluoroquinolone resistance could be realized.

**Keywords:** *C. amycolatum*, *C. jeikeium*, *C. striatum*, *C. urealyticum*, *C. aurimucosum*, genomes, antimicrobial resistance genes, *gyrA*, antimicrobial drugs

**Author contribution:** Kulshan TA — study planning, literature review, dealing with molecular genetic data (selection of genomes, genome annotation, comparative analysis of *gyrA* amino acid sequences), data analysis, manuscript writing; Bugaeva IO — study planning, data analysis, interpretation of findings, manuscript writing; Soboleva EF — literature review, data analysis, manuscript writing; Allyanova MS — literature review, analysis of the antimicrobial resistance gene pool in the genomes of corynebacterial strains, dealing with the PATRIC online service; Popov DA — literature review, search for *gyrA* amino acid sequences in the genomes of corynebacterial strains, comparative analysis of amino acid sequences; Shvidenko IG — advising during manuscript writing, data analysis.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana A. Kulshan  
B. Kazachya, 112, Saratov, 410012, Russia; tatjana.kulshan@yandex.ru

**Received:** 20.10.2023 **Accepted:** 03.12.2023 **Published online:** 19.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.047

В настоящее время множественная антимикробная резистентность бактериальных инфекционных агентов представляет серьезную угрозу для мирового здравоохранения. Нерациональное применение антимикробных препаратов для лечения людей, использование их в животноводстве и сельском хозяйстве —

определяющие факторы широкого распространения лекарственной устойчивости у бактерий [1–3].

Селективное давление антимикробных препаратов на бактериальную популяцию способствует реализации различных механизмов резистентности, которые возникают в результате приобретения генетических

Таблица 1. Штаммы представителей рода *Corynebacterium*, полногеномные нуклеотидные последовательности которых использованы в работе

№	Штамм	Год, место, источник выделения	Код доступа GenBank:
1	<i>Corynebacterium amycolatum</i> BER245	2011, Бразилия, человек (материал из уха)	CP102778.1
2	<i>Corynebacterium amycolatum</i> ICIS 53	2016, Россия, человек (вагинальное содержимое)	MIFV00000000
3	<i>Corynebacterium amycolatum</i> VH6958	2016, Испания, человек	JAFJMB000000000.1
4	<i>Corynebacterium amycolatum</i> ICIS 9	2017, Россия, человек (вагинальное содержимое)	MTPT00000000.1
5	<i>Corynebacterium amycolatum</i> SB-1	2019, Южная Корея, человек (кожа)	CP120206.1
6	<i>Corynebacterium amycolatum</i> ICIS 99	2020, Россия, человек (вагинальное содержимое)	JAIUSU000000000
7	<i>Corynebacterium amycolatum</i> 1189	н/и, Германия, н/и	CP069513.1
8	<i>Corynebacterium urealyticum</i> DSM 7109	1985, Германия, человек (моча)	AM942444
9	<i>Corynebacterium urealyticum</i> VH3073	2017, Испания, человек (моча)	VTFJ00000000
10	<i>Corynebacterium urealyticum</i> 996	н/и, Германия, н/и	CP065982.1
11	<i>Corynebacterium urealyticum</i> 994	н/и, Германия, н/и	CP066064.1
12	<i>Corynebacterium striatum</i> 2308	2011, Бразилия, человек (кровь)	NRIO00000000.1
13	<i>Corynebacterium striatum</i> 708C	2021, Великобритания, (суставная жидкость)	JASNMG000000000
14	<i>Corynebacterium striatum</i> 824M	2022, Великобритания, кровь	JASNMH000000000
15	<i>Corynebacterium striatum</i> 1197	н/и, Германия, н/и	CP069514.1
16	<i>Corynebacterium striatum</i> 1115	н/и, Германия, н/и	CP068158.1
17	<i>Corynebacterium striatum</i> ATCC 6940	н/и, человек (урогенитальный тракт)	ACGE00000000
18	<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	2004, Германия, человек (подмышечная впадина)	CR931997.1
19	<i>Corynebacterium jeikeium</i> 574	2016, США, человек	CP033784.1
20	<i>Corynebacterium jeikeium</i> ATCC 43734	н/и, человек (урогенитальный тракт)	ACYW00000000
21	<i>Corynebacterium aurimucosum</i> UMB7769	2013, США, человек (моча)	JASOLN000000000
22	<i>Corynebacterium genitalium</i> ATCC 33030	н/и, США, человек (урогенитальный тракт)	ACLJ00000000

детерминант устойчивости или спонтанных мутаций [1, 4–6]. Изучение эволюционных преобразований в бактериальных геномах, связанных с антибиотикорезистентностью, способствует оптимизации терапевтических стратегий и профилактических мер.

На сегодняшний день увеличение роли представителей нормальной микрофлоры, в частности представителей рода *Corynebacterium*, в инфекционной патологии также может быть связано с распространением в геномах бактерий генов антимикробной устойчивости. Все более частое выделение коринебактерий в качестве патогенов, особенно у людей с ослабленным иммунитетом, свидетельствует о повышении их роли в развитии инфекционных осложнений у пациентов [2].

Особое значение в развитии инфекций имеют следующие виды коринебактерий: *C. amycolatum* (инфекции кожи и мягких тканей, бактериемия, эндокардит, инфекции половой системы), *C. urealyticum* (острые и хронические инфекции мочевыводящих путей, мочекаменная болезнь), *C. striatum* (истинная бактериемия, колонизация протезов, катетеров, дыхательных трубок и т. д.), *C. jeikeium* (бактериемия, эндокардиты, пневмонии, инфекции кожи и мягких тканей), *C. aurimucosum* (острые или хронические инфекции суставов, инфицирование ран диабетической стопы), *C. genitalium* (инфекции мочеполовых путей) [2, 3, 5, 7–14]. Стоит отметить множественную лекарственную устойчивость некоторых видов коринебактерий к  $\beta$ -лактамам, макролидам, аминогликозидам, хинолонам, тетрациклинам и рифампицинам, линкозамидам и др. [1, 4, 12–14].

Тем не менее, данные о резистентности коринебактерий к лекарственным средствам разноречивы, в этой связи целью исследования стало проведение биоинформатического анализа спектра генов устойчивости

к антимикробным препаратам в опубликованных геномах некоторых представителей рода *Corynebacterium*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали данные о нуклеотидных последовательностях полных геномов 22 штаммов 6 видов коринебактерий (*C. amycolatum*, *C. urealyticum*, *C. striatum*, *C. jeikeium*, *C. aurimucosum*, *C. genitalium*), представленных в свободном доступе в NCBI GenBank, выделенных на территории различных стран и в разные годы (табл. 1).

Биоинформатический анализ полногеномных последовательностей с целью поиска генов антимикробной устойчивости в указанных геномах осуществляли с помощью онлайн-ресурса PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center) с использованием комплексной базы данных по исследованиям антибиотиков (Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD) и базы данных устойчивых к антибиотикам организмов (Database of Antibiotic-Resistant Organisms, NDARO) [15].

Аминокислотные последовательности гена *gyrA* были взяты из репозитория Genbank. Для анализа аминокислотных последовательностей гена *gyrA* использовали программное обеспечение UGENE (Unipro UGENE) 48.1 [16]. Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы MUSCLE, интегрированной в UGENE.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе проведенного биоинформатического анализа было установлено, что представленные геномы в различных комбинациях содержали гены устойчивости к антимикробным препаратам. Всего было определено

**Таблица 2.** Перечень генов устойчивости к антимикробным препаратам, обнаруженных в геномах изучаемых штаммов рода *Corynebacterium* с помощью онлайн-ресурса PATRIC

Антимикробные препараты	Гены, кодирующие антимикробную устойчивость
Липопептиды	<i>pgsA, gdpD (ugpQ, glpQ)</i>
Макролиды, пенициллины	<i>mtrA, mtrB</i>
Макролиды, линкозамиды, стрептограммы	<i>ermX</i>
Диаминопиримидины	<i>folA (dfr)</i>
Тетрациклины, глицилциклины	<i>s10p (rpsJ)</i>
Тетрациклины	<i>tetO (tetW)</i>
Сульфаниламиды	<i>folP</i>
Аминогликозиды	<i>s12p (rpsL, rpsJ), gibB, aph(3')-I, aph(6)-Ic</i>
Фузидиевая кислота	<i>ef-G (fusA), Isu (rplF)</i>
Циклосерин	<i>alc, dlr</i>
Изониазид	<i>oxyR</i>
Фосфомицины	<i>murA, ispC (dxr)</i>
Хлорамфеникол	<i>cmx</i>
Муропироцин	<i>ileS</i>
Триклозан	<i>fabG</i>
Бицикломицин	<i>rho</i>
Эльфамицины	<i>ef-Tu(tufA)</i>

25 разных генов, кодирующих устойчивость к лекарственным средствам антимикробной направленности (табл. 2).

Стоит отметить, что значительно реже в геномах изучаемых изолятов встречались гены (табл. 3):

1) *tetO (tetW)* (кодирует устойчивость к тетрациклину) — отсутствовал в геноме 19 штаммов (86,4%);

2) *aph (3')-I, aph (6)-Ic* (кодируют устойчивость к аминогликозидам) — отсутствовали в геноме 14 штаммов (63,6%);

3) *ermX* (кодирует устойчивость к макролидам, линкозамидам, стрептограммам) — отсутствовал в геноме 13 штаммов (59%);

4) *Isu (rplF)* (кодирует устойчивость к фузидиевой кислоте) — отсутствовал в геноме 12 штаммов (54,5%);

5) *cmx* (кодирует устойчивость к хлорамфениколу) — отсутствовал в геноме 8 штаммов (36,4,3%);

6) *ispC (dxr)* (кодирует устойчивость к фосфомицину) — отсутствовал в геноме 7 штаммов (32%);

7) *gibB* (кодирует устойчивость к аминогликозидам), *oxyR* (кодирует устойчивость к изониазиду), *fabG* (кодирует устойчивость к триклозану) — отсутствовали в геномах 1 штамма (4,5%) (*Corynebacterium striatum* 824M, *Corynebacterium striatum* 1197, *Corynebacterium striatum* 708C соответственно).

Вместе с тем, устойчивость к аминогликозидам, фузидиевой кислоте, фосфомицинам кодировалась несколькими генами, в этой связи отсутствие в геноме одного из генов не может быть свидетельством чувствительности изолята к данным антимикробным веществам.

Все остальные гены, представленные в табл. 2, встречались в геномах 22 штаммов коринебактерий в 100% случаев.

Штаммом, содержащим 24 из 25 обнаруженных генов антимикробной резистентности, был *C. striatum* 2308. В его геноме отсутствовал только ген *tetO (tetW)*. По литературным данным известно, что штамм был выделен в 2011 г. из гемокультуры мужчины, который находился на

лечении в больнице Рио-де-Жанейро. По фенотипической характеристике был чувствителен только к тетрациклину (МПК 1 мг/л), линезолиду (МИК 0,25 мг/л) и ванкомицину (МИК 0,5 мг/л) [12]. Данные биоинформатического анализа, полученные нами, подтверждают результаты фенотипического исследования [12]: отсутствие гена *tetO (tetW)* (устойчивость к тетрациклину), отсутствие генов устойчивости к оксазолидонам (линезолид) и гликопептидам (ванкомицин). Стоит отметить, что генов резистентности к линезолиду и ванкомицину не было обнаружено ни у одного исследуемого штамма. Однако авторы указывают, что фенотипически данный штамм был устойчив к эритромицину (МИК > 256 мг/л) и клиндамицину (МПК > 256 мг/л), гентамицину (аминогликозид) (МИК 256 мг/л) [12]. Такие фенотипические проявления могут быть обусловлены присутствием генов *ermX* и *aph (3')-I, aph (6)-Ic*.

Еще одним штаммом, в геноме которого отсутствовал лишь ген *ispC (dxr)* (устойчивость к фосфомицину), стал *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9, выделенный из влагалища здоровой женщины в 2017 г. в России. Вместе с тем, устойчивость к фосфомицинам кодируется еще и геном *murA*, который присутствовал в геноме. *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9 авторы публикации рассматривали в качестве возможного пробиотического препарата при лечении дисбиоза влагалища [9–11]. Была установлена фенотипическая устойчивость *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9 к антимикробным препаратам (амикацину, гентамицину (аминогликозиды), амоксициллину (бета-лактамы), кларитромицину (макролид), хлорамфениколу, ципрофлоксацину (фторхинолон) и тетрациклину) [9–11]. Действительно, в ходе проведенного нами биоинформатического исследования в геноме данного изолята содержались гены, кодирующие устойчивость к пенициллинам, аминогликозидам, макролидам, хлорамфениколам, фторхинолонам и тетрациклину (табл. 2).

Что касается штаммов, в геноме которых отсутствует значительное количество генов антимикробной резистентности (от 6 до 10 генов), то к ним относились:

Таблица 3. Перечень генов устойчивости к антимикробным препаратам, отсутствующих в геномах изучаемых штаммов рода *Corynebacterium*

№	Штамм	Отсутствующие в геноме гены антимикробной резистентности
1	<i>Corynebacterium amycolatum</i> BER245	<i>ermX, tetO (tetW), ispC (dxr)</i>
2	<i>Corynebacterium amycolatum</i> ICIS 53	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), ispC (dxr), cmx</i>
3	<i>Corynebacterium amycolatum</i> VH6958	<i>tetO (tetW), lsu (rplF), ispC (dxr)</i>
4	<i>Corynebacterium amycolatum</i> ICIS 9	<i>ispC (dxr)</i>
5	<i>Corynebacterium amycolatum</i> SB-1	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), ispC (dxr), cmx</i>
6	<i>Corynebacterium amycolatum</i> ICIS 99	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), ispC (dxr)</i>
7	<i>Corynebacterium amycolatum</i> 1189	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), ispC (dxr), cmx</i>
8	<i>Corynebacterium urealyticum</i> DSM 7109	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I</i>
9	<i>Corynebacterium urealyticum</i> VH3073	<i>tetO (tetW), lsu (rplF)</i>
10	<i>Corynebacterium urealyticum</i> 996	<i>ermX, tetO (tetW), lsu (rplF)</i>
11	<i>Corynebacterium urealyticum</i> 994	<i>tetO (tetW), lsu (rplF)</i>
12	<i>Corynebacterium striatum</i> 2308	<i>tetO (tetW)</i>
13	<i>Corynebacterium striatum</i> 708C	<i>mtrA, mtrB, ermX, tetO (tetW), gibB, aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), fabG, cmx</i>
14	<i>Corynebacterium striatum</i> 824M	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), gibB</i>
15	<i>Corynebacterium striatum</i> 1197	<i>oxyR</i>
16	<i>Corynebacterium striatum</i> 1115	<i>tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), cmx</i>
17	<i>Corynebacterium striatum</i> ATCC 6940	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I</i>
18	<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I</i>
19	<i>Corynebacterium jeikeium</i> 574	<i>tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), cmx</i>
20	<i>Corynebacterium jeikeium</i> ATCC 43734	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I</i>
21	<i>Corynebacterium aurimucosum</i> UMB776	<i>aph(3')-I, aph(6)-I, lsu (rplF), cmx</i>
22	<i>Corynebacterium genitalium</i> ATCC 33030	<i>ermX, tetO (tetW), aph(3')-I, aph(6)-I, cmx</i>

*C. amycolatum* ICIS 99, *C. amycolatum* ICIS 53, *C. amycolatum* SB-1, *C. amycolatum* 1189, *C. striatum* 824M, *C. striatum* 708 (табл. 3).

Наименьшее количество генов резистентности к антимикробным препаратам (19 генов) содержал штамм *C. striatum* 708, выделенный из суставной жидкости пациента в Великобритании (BioSample: SAMN34403526).

В настоящее время выделяют множество причин антимикробной устойчивости микроорганизмов. Это явление обусловлено не только присутствием генетических детерминант, ассоциированных с антимикробной устойчивостью, но и различными мутациями в данных генах. Обнаружено, что мутации в коротких областях генов *gyrA* и *gyrB* (регионы, определяющие устойчивость к хинолонам (QRDR)), кодирующих А и В субъединицы ДНК-гиразы, приводят к формированию устойчивости к хинолонам/фторхинолонам [9].

У коринебактерий устойчивость к хинолонам/фторхинолонам обусловлена спонтанными мутациями в гене, кодирующем субъединицу фермента гиразы А [12, 13]. Установлено, что мутации, связанные с изменением аминокислот в положениях 87, 88 и 91, повышают минимальные ингибирующие концентрации (МИК) хинолонов/фторхинолонов. Так, замены в 87 позиции Ser (S) на Arg (R), Phe (F), Val (V), в 88 позиции — Ala (A) на Pro (P), в 91 позиции — Asp (D) на Tyr (Y), Gly (G), Ala (A) повышали МИК ципрофлоксацина, левофлоксацина и моксифлоксацина [12, 13]. В этой связи мы посчитали необходимым провести молекулярно-генетический анализ аминокислотной последовательности данного гена у 22 изучаемых штаммов. Для проведения сравнительного анализа и определения номера аминокислотной позиции в качестве референса был использован *GyrA* *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (код доступа GenBank: NP599264) [13].

Согласно литературным данным, изоляты *C. striatum* ATCC 6940, *C. jeikeium* ATCC 43734 и *C. urealyticum* DSM 7109 обладали чувствительностью к хинолонам/фторхинолонам [13]. Аминокислотные последовательности гена *gyrA* данных штаммов использовали в качестве контроля.

В ходе анализа установлено, что штаммы *C. striatum* ATCC 6940, *C. jeikeium* ATCC 43734, *C. amycolatum* 1189, *C. aurimucosum* UMB7769, *C. striatum* 1115, *C. urealyticum* 994, *C. urealyticum* 996, *C. urealyticum* DSM 7109, *C. jeikeium* K411, *C. amycolatum* SB-1, *C. genitalium* ATCC 33030 имели в позиции 87 аминокислоту Ser (S), в 91 позиции — Asp (D). По литературным данным, такая структура гена позволяла им быть чувствительными к хинолонам/фторхинолонам, несмотря на наличие генов резистентности [12, 13].

В 87 позиции замену Ser (S) на Arg (R) отмечали у *C. amycolatum* ICIS 53, *C. amycolatum* ICIS 99. У штамма *C. amycolatum* VH6958 кроме замены Ser (S) на Arg (R) в позиции 87 наблюдали также замену в 88 позиции Ala (A) на Pro (P). Стоит обратить внимание на штамм *C. amycolatum* BER245, у которого кроме замены Ser (S) на Arg (R) в позиции 87 наблюдали замену Asp (D) на Tyr (Y) в 91 позиции. Такие мутации резко повышали МИК к хинолонам/фторхинолонам [12, 13].

*C. urealyticum* VH3073 имел две уникальные замены: 87 — Ser (S)/ Val (V) и 91 — Asp (D)/ Tyr (Y). *C. striatum* 2308, *C. striatum* 708C, *C. striatum* 824M имели лишь одну аминокислотную замену 87 — Ser (S)/ Val (V). Вместе с тем обнаружены штаммы, несущие уникальные замены: 87 — Ser (S)/ Ile (I), 91 — Asp (D)/ Ala (A) — *C. amycolatum* ICIS 9; 87 — Ser (S)/ Ile (I), 91 — Asp (D)/ Gly (G) — *C. jeikeium* 574; 87 — Ser (S)/ Phe (F), 91 — Asp (D)/ Gly (G) — *C. striatum* 1197 (рис.). Эволюционное значение данных замен предстоит определить в дальнейших исследованиях.

Таким образом, в 87 позиции 11 изолятов имеют аминокислоту Ser (S), 4 штамма — Val (V), 4 штамма — Arg

Консенсусная последовательность:

***C. glutamicum*\_ATCC\_13032**  
***C. striatum*\_ATCC\_6940**  
***C. jeikeium*\_ATCC\_43734**  
***C. amycolatum*\_FDAARGOS\_1189**  
***C. aurimucosum*\_UMB7769**  
***C. striatum*\_FDAARGOS\_1115**  
***C. urealyticum*\_FDAARGOS\_994**  
***C. urealyticum*\_FDAARGOS\_996**  
***C. jeikeium*\_K411**  
***C. urealyticum*\_DSM\_7109**  
***C. amycolatum*\_SB-1**  
***C. genitalium*\_ATCC\_33030**  
***C. amycolatum*\_ICIS\_53**  
***C. amycolatum*\_ICIS\_99**  
***C. amycolatum*\_VH6958**  
***C. amycolatum*\_BER245**  
***C. urealyticum*\_VH3073**  
***C. striatum*\_2308**  
***C. striatum*\_708C**  
***C. striatum*\_824M**  
***C. amycolatum*\_ICIS\_9**  
***C. jeikeium*\_FDAARGOS\_574**  
***C. striatum*\_FDAARGOS\_1197**

	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	M	A	Q	P	W
86	T	A	I	Y	D	T	L	V	R	M	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	S	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	S	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	M	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	M	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	M	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	P	W
86	R	A	I	Y	D	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	R	A	I	Y	D	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	R	P	V	Y	D	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	R	A	I	Y	Y	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	V	A	I	Y	Y	T	L	V	R	M	A	Q	P	W
86	V	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	S	W
86	V	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	S	W
86	V	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A	Q	S	W
86	I	A	I	Y	A	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	I	A	I	Y	G	T	M	V	R	M	A	Q	P	W
86	F	A	I	Y	G	T	L	V	R	L	A	Q	S	W

**Рис.** Аминокислотная последовательность гена *gyrA* штаммов рода *Corynebacterium*, взятых в качестве примера. Рамкой выделены позиции точечных мутаций в аминокислотной последовательности гена *gyrA*, влияющие по литературным данным на повышение минимальной подавляющей концентрации (МИК) к хинолонам/фторхинолонам

(R), 2 штамма — Ile (I), 1 штамм — Phe (F). В 88 позиции 21 штамм имеет Ala (A), 1 изолят — Pro (P). В 91 позиции 17 изолятов имеют аминокислоту Asp (D), 2 штамма — Tyr (Y), 2 штамма — Gly (G), 1 штамм — Ala (A).

Подводя итог, стоит отметить, что двойные мутации в гене *gyrA*, описанные в литературе как вызывающие резкое повышение МИК к хинолонам/фторхинолонам, были обнаружены у: *C. amycolatum* VH6958, выделенного в 2016 г. в Испании (BioSample: SAMN18038700) — замена в 87 позиции Ser (S) на Arg (R), замена в 88 позиции Ala (A) на Pro (P). *C. amycolatum* BER245, выделенный в 2011 г. в Бразилии от больного отитом — замена в позиции 87 Ser (S) на Arg (R), в 91 позиции замена Asp (D) на Tyr (Y). *C. urealyticum* VH3073, выделенный в 2017 г. в Испании из мочи пациента (BioSample: SAMN12621417), замена в 87 позиции Ser (S)/ Val (V) и 91 — Asp (D)/ Tyr (Y).

У двух штаммов (*C. amycolatum* ICIS 53, *C. amycolatum* ICIS 99) отмечали одну мутацию — Ser (S) на Arg (R).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Распространение генов устойчивости к антимикробным препаратам посредством горизонтального переноса вызывает увеличение количества устойчивых микроорганизмов, в том числе и среди представителей условно-патогенной флоры. Стоит отметить, что штаммы коринебактерий, например, штаммы *C. amycolatum* ICIS 53, *C. amycolatum* ICIS 9, *C. amycolatum* ICIS 99, выделенные из

вагинального содержимого здоровых женщин, обладали достаточно большим арсеналом генов антимикробной резистентности [9, 11]. В этой связи необходим постоянный мониторинг за антимикробной устойчивостью бактерий с целью разработки эффективных мер по борьбе с ростом их устойчивости к антимикробным препаратам. Базы данных, содержащие сведения об устойчивости бактерий к антибиотикам, позволяют сравнивать результаты, полученные с помощью различных методов, проводить оценку распространенности генов антимикробной устойчивости.

Полученные нами результаты позволили выделить основной набор генов антимикробной устойчивости, содержащийся в геномах коринебактерий. Эти данные могут быть использованы в качестве возможной оценки применения антимикробных препаратов для лечения пациентов. Тем не менее молекулярно-генетические исследования должны сочетаться с другими методами, основанными на фенотипической оценке чувствительности к лекарственным средствам, поскольку не всегда данные по фенотипической и генотипической резистентности коррелируют между собой.

Устойчивость к антимикробным препаратам может быть связана с различными мутационными изменениями, в частности, устойчивость к хинолонам/фторхинолонам в основном реализуется за счет приобретения точечных мутаций в последовательности гена *gyrA*, кодирующего субъединицу А ДНК-гиразы, а сверхэкспрессия

эффлюксного насоса может играть дополнительную роль в приобретении устойчивости к хинолонам [12, 13]. У *C. amycolatum* изменение в положении 87 *GyrA* придавало устойчивость ко всем протестированным хинолонам/фторхинолонам [12, 13]. Данные замены мы увидели и в анализируемых нами геномах штаммов *C. amycolatum*. Вместе с тем, некоторые коринебактерии несли несколько мутаций в аминокислотной последовательности гена *gyrA*, повышающих МИК к хинолонам/фторхинолонам [12, 13]. Исследование мутационной изменчивости в генах играет важную роль в изучении эволюционных преобразований в геномах бактерий и может использоваться для разработки молекулярных экспресс-методов диагностики.

## ВЫВОДЫ

Нарастающая этиологическая значимость коринебактерий в инфекционной патологии, особенно в качестве госпитальных патогенов среди пациентов с ослабленным иммунитетом, которые перенесли длительную госпитализацию, несколько курсов антибиотикотерапии и для лечения которых использовали инвазивные медицинские устройства, определяет необходимость регулярного мониторинга патогенов. Устойчивость бактерий к антимикробным препаратам вызывает серьезную озабоченность, в связи

с этим в настоящей работе: 1) установлено присутствие в геномах коринебактерий большого арсенала генов (25 генов) антимикробной устойчивости в различных комбинациях. Присутствие гена коррелирует со способностью изолята обладать устойчивостью к противомикробным препаратам. Это важное эволюционное последствие воздействия антибиотиков на популяционную структуру микроорганизмов. Стоит отметить, что резистентность к антимикробным препаратам чаще всего кодируется несколькими генами. Вариабельность детерминант противомикробной устойчивости подчеркивает необходимость постоянного наблюдения за профилями резистентности коринебактерий; 2) выявлены мутации в аминокислотных последовательностях гена *gyrA* изучаемых штаммов (в позициях 87, 88, 91), которые ассоциируют с устойчивостью к хинолонам/фторхинолонам.

Цель работы достигнута. Ограниченность данных по изучению коринебактерий, в том числе молекулярно-генетических, затрудняет проведение сравнительного анализа. Расширение спектра штаммов, в том числе представленных в различных базах данных, позволит иметь более полное представление о строении генома, фенотипических характеристиках, а выявление спектра генов антимикробной устойчивости позволит иметь более полное представление о направлениях антибактериальной терапии.

## Литература

1. Харсеева Г. Г., Воронина Н. А., Гасретова Т. Д., Тюкавкина С. Ю., Сылка О. И., Миронов А. Ю. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных в стационарах Ростова-на-Дону и Ростовской области. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (8): 502–6.
2. Fernandez LV, Fortuny AS, Rodriguez EF. *Corynebacterium ruviciproducens* and *Corynebacterium amycolatum* mastitis in immunocompetent no breastfeeding women. Revista Argentina de Microbiologia. 2021; 53 (11): 39–42.
3. Jesus HNR, Rocha DJPG, Ramos RTJ, Silva A, Brenig B, Góes-Neto A, et al. Pan-genomic analysis of *Corynebacterium amycolatum* gives insights into molecular mechanisms underpinning the transition to a pathogenic phenotype. Front Microbiol. 2022; 13: 1–11.
4. Харсеева Г. Г., Воронина Н. А., Миронов А. Ю., Харисова А. Р. Антибиотикочувствительность штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, циркулирующих в Ростове-на Дону и Ростовской области. Клиническая лабораторная диагностика. 2012; 10: 62–4.
5. Alibi S, Ferjani A, Boukadida J, Cano ME, Fernández-Martínez M, Martínez-Martínez L, et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. Sci Rep. 2017; 7: 1–8. PubMed PMID: 28848236.
6. Харсеева Г. Г., Мангутов Э. О. Бут О. М., Чепусова А. В., Алутина Э. Л. Анализ частоты выделения недифтерийных коринебактерий от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (7): 430–34.
7. Sahu V, Pathak MM, Das P, Ravi A. *Corynebacterium jeikeium* as an unusual cause of keratitis: a case report from a tertiary care hospital in Chhattisgarh, India. Cureus. 2021; 13 (12): 1–11.
8. Salem N, Salem L, Saber S, Ismail G, Bluth MH. *Corynebacterium urealyticum*: a comprehensive review of an understated organism. Infection and Drug Resistance. 2015; 8: 129–45.
9. Gladysheva IV, Chertkov KL, Cherkasov SV, Khlopko YA, Kataev VY, Valyshev AV. Probiotic potential, safety properties, and antifungal activities of *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9 and *Corynebacterium amycolatum* ICIS 53 strains. Probiotics Antimicrob Proteins. 2023; 15 (3): 588–600. PubMed PMID: 34807410.
10. Gladysheva IV, Cherkasov SV, Khlopko YA, Plotnikov AO. Genome characterization and probiotic potential of *Corynebacterium amycolatum* human vaginal isolates. Microorganisms. 2022; 10 (2): 1–17. PubMed PMID: 35208706.
11. Gladysheva IV, Khlopko YA, Cherkasov SV. Draft genome sequence of the vaginal isolate *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9. Genome Announc. 2017; 5 (37): 1–2. PubMed PMID: 28912325.
12. Ramos JN, Rodrigues IDS, Baio Pa VP, Veras JFC, Ramos RTJ, Pacheco LG, et al. Genome sequence of a multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* isolated from bloodstream infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2018; 113 (9): 1–5.
13. Sierra JM, Martínez-Martínez L, Vázquez F, Giralt E, Vila J. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49 (5): 1714–19. PubMed PMID: 15855486.
14. Silva-Santana G, Silva CMF, Olivella JGB, Silva IF, Fernandes LMO, Sued-Karam BR. Worldwide survey of *Corynebacterium striatum* increasingly associated with human invasive infections, nosocomial outbreak, and antimicrobial multidrug-resistance, 1976–2020. Arch Microbiol. 2021; 203 (5): 1863–80. PubMed PMID: 33625540.
15. PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center). Available from: <https://www.patricbrc.org>.
16. UGENE (Unipro UGENE) 48.1. Available from: <https://ugene.net/ru/>.

## References

1. Kharseeva GG, Voronina NA, Gasretova TD, Tyukavkina SYu, Sylka OI, Mironov AYu. The sensitivity to antibiotics of *Corynebacterium non diphtheriae* isolated in hospitals of Rostov-on-don and the Rostovskaya oblast. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2017; 62 (8): 502–6. Russian.
2. Fernandez LV, Fortuny AS, Rodriguez EF. *Corynebacterium pyruviciproducens* and *Corynebacterium amycolatum* mastitis in immunocompetent no breastfeeding women. *Revista Argentina de Microbiologia*. 2021; 53 (11): 39–42.
3. Jesus HNR, Rocha DJPG, Ramos RTJ, Silva A, Brenig B, Góes-Neto A, et al. Pan-genomic analysis of *Corynebacterium amycolatum* gives insights into molecular mechanisms underpinning the transition to a pathogenic phenotype. *Front Microbiol*. 2022; 13: 1–11.
4. Kharseeva GG, Voronina NA, Mironov AYu, Kharysova AR. The antibiotics sensitivity of strains of *Corynebacterium non diphtheriae* circulating in Rostov-on-don and Rostov oblast. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2012; 10: 62–4. Russian.
5. Alibi S, Ferjani A, Boukadida J, Cano ME, Fernández-Martínez M, Martínez-Martínez L, et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Sci Rep*. 2017; 7: 1–8. PubMed PMID: 28848236.
6. Kharseeva GG, Mangutov EO, But OM, Chepusova AV, Alutina EL. Analysis of the frequency of allocation of *Corynebacteria non diphtheria* from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2019; 64 (7): 430–34. Russian.
7. Sahu V, Pathak MM, Das P, Ravi A. *Corynebacterium jeikeium* as an unusual cause of keratitis: a case report from a tertiary care hospital in Chhattisgarh, India. *Cureus*. 2021; 13 (12): 1–11.
8. Salem N, Salem L, Saber S, Ismail G, Bluth MH. *Corynebacterium urealyticum*: a comprehensive review of an understated organism. *Infection and Drug Resistance*. 2015; 8: 129–45.
9. Gladysheva IV, Chertkov KL, Cherkasov SV, Khlopko YA, Kataev VY, Valyshev AV. Probiotic potential, safety properties, and antifungal activities of *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9 and *Corynebacterium amycolatum* ICIS 53 strains. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2023; 15 (3): 588–600. PubMed PMID: 34807410.
10. Gladysheva IV, Cherkasov SV, Khlopko YA, Plotnikov AO. Genome characterization and probiotic potential of *Corynebacterium amycolatum* human vaginal isolates. *Microorganisms*. 2022; 10 (2): 1–17. PubMed PMID: 35208706.
11. Gladysheva IV, Khlopko YA, Cherkasov SV. Draft genome sequence of the vaginal isolate *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9. *Genome Announc*. 2017; 5 (37): 1–2. PubMed PMID: 28912325.
12. Ramos JN, Rodrigues IDS, Baio Pa VP, Veras JFC, Ramos RTJ, Pacheco LG, et al. Genome sequence of a multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* isolated from bloodstream infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2018; 113 (9): 1–5.
13. Sierra JM, Martínez-Martínez L, Vázquez F, Giralt E, Vila J. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49 (5): 1714–19. PubMed PMID: 15855486.
14. Silva-Santana G, Silva CMF, Olivella JGB, Silva IF, Fernandes LMO, Sued-Karam BR. Worldwide survey of *Corynebacterium striatum* increasingly associated with human invasive infections, nosocomial outbreak, and antimicrobial multidrug-resistance, 1976–2020. *Arch Microbiol*. 2021; 203 (5): 1863–80. PubMed PMID: 33625540.
15. PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center). Available from: <https://www.patricbrc.org>.
16. UGENE (Unipro UGENE) 48.1. Available from: <https://ugene.net/ru/>.

## ВЛИЯНИЕ НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ мРНК НА ИММУНОГЕННОСТЬ мРНК-ВАКЦИН ПРОТИВ *M. TUBERCULOSIS* У МЫШЕЙ

Г. С. Шепелькова<sup>1</sup>✉, В. В. Решетников<sup>2,3</sup>, В. Г. Авдиенко<sup>1</sup>, Д. В. Шевырев<sup>2</sup>, В. В. Еремеев<sup>1</sup>, Р. А. Иванов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

<sup>2</sup> Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

<sup>3</sup> Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Вакцинация является одним из наиболее успешных медицинских мероприятий по снижению заболеваемости и смертности от туберкулеза. В 1974 г. вакцинация БЦЖ была включена в Расширенную программу вакцинации, и на сегодня охватывает 80% всех детей на земном шаре. К сожалению, вакцина БЦЖ не защищает от наиболее распространенной формы туберкулеза — туберкулеза легких. Требуется срочно разработать новые стратегии вакцинации, чтобы остановить широкомасштабное распространение инфекции с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. Целью исследования было сравнить способность трех вариантов мРНК-вакцин, кодирующих эпитопы ESAT6, стимулировать формирование адаптивного иммунитета у мышей C57BL/6 (ELISpot, ГЗТ, титры IgG), а также защищать мышей I/St от заражения *M. tuberculosis*. Эффективность упакованных в нанولیпидные частицы мРНК-вакцин, различающихся последовательностями нетранслируемых регионов, сравнивали с эффективностью БЦЖ. В полученной нами экспериментальной модели максимальную эффективность по большинству показателей продемонстрировала вакцина 5'-TPL-Esat6-3'-Mod. Таким образом, мРНК-вакцина 5'-TPL-Esat6-3'-Mod может быть рассмотрена в качестве кандидатной для дальнейшей оптимизации, повышения ее эффективности и последующего применения для профилактики туберкулеза.

**Ключевые слова:** мРНК-вакцины, БЦЖ, адаптивный иммунный ответ, туберкулез

**Финансирование:** исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-113, уникальный идентификатор проекта РФ----193021X0001).

**Благодарности:** авторы выражают благодарность сотрудникам АНО ВО «Университет «Сириус» И. М. Теренину за постановку транскрипции *in vitro*, О. В. Заборовой за формулировку мРНК в липидные наночастицы.

**Вклад авторов:** Г. С. Шепелькова — планирование и постановка экспериментов (*in vivo* и *ex vivo*), анализ результатов, написание рукописи; В. В. Решетников — клонирование, подготовка мРНК вакцины, написание рукописи; В. Г. Авдиенко — постановка экспериментов (*in vivo* и *ex vivo*), анализ результатов; Д. В. Шевырев — подготовка мРНК вакцины, анализ результатов; В. В. Еремеев — дизайн исследования, анализ результатов, написание рукописи; Р. А. Иванов — дизайн исследования, написание рукописи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ЦНИИТ» (протокол № 3/2 от 11 мая 2023 г.), проведено в соответствии с Приказом Минздрава № 755 и Руководством Управления по охране лабораторных животных А5502-01.

✉ **Для корреспонденции:** Галина Сергеевна Шепелькова, Яузская аллея, д. 2, 107564, г. Москва, Россия; g.shepelkova@ctri.ru; Василий Владимирович Решетников, Олимпийский пр-т, д. 1, г. Сочи, 354340, Россия; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

**Статья получена:** 17.11.2023 **Статья принята к печати:** 19.12.2023 **Опубликована онлайн:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.054

## IMPACT OF UNTRANSLATED mRNA SEQUENCES ON IMMUNOGENICITY OF mRNA VACCINES AGAINST *M. TUBERCULOSIS* IN MICE

Shepelkova GS<sup>1</sup>✉, Reshetnikov VV<sup>2,3</sup>, Avdienko VG<sup>1</sup>, Sheverev DV<sup>2</sup>, Yermeev VV<sup>1</sup>, Ivanov RA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

<sup>3</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Vaccination is among the most effective measures to reduce tuberculosis morbidity and mortality. In 1974, BCG vaccination was included in the Expanded Program on Immunization. Today, it covers 80% of all children around the globe. Unfortunately, BCG vaccine provides no protection against pulmonary tuberculosis, the most prevalent form of tuberculosis. It is necessary to urgently develop new vaccination strategies to stop large-scale dissemination of infection caused by the multidrug-resistant pathogen. The study was aimed to compare the capabilities of three variants of mRNA vaccines encoding ESAT6 epitopes of stimulating adaptive immune response formation in C57BL/6 mice (ELISpot, delayed hypersensitivity, IgG titers), as well as of protecting I/St mice against *M. tuberculosis* infection. Efficacy of mRNA vaccines comprising different untranslated regions packaged in lipid nanoparticles was compared with that of BCG vaccine. The 5'-TPL-Esat6-3'-Mod vaccine demonstrated the highest efficacy in our experimental model. Thus, the 5'-TPL-Esat6-3'-Mod mRNA vaccine can be considered as a candidate vaccine for further optimization, improving efficacy and subsequent use for prevention of tuberculosis.

**Keywords:** mRNA vaccine, BCG, adaptive immune response, tuberculosis

**Funding:** the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement № 075-10-2021-113, project ID RF----193021X0001).

**Acknowledgements:** the authors express their gratitude to staff members of the Sirius University of Science and Technology I. M. Terenin for *in vitro* transcription, O. V. Zaborova for mRNA formulation into lipid nanoparticles.

**Author contribution:** Shepelkova GS — planning the experiments and experimental procedure (*in vivo* and *ex vivo*), data analysis, manuscript writing; Reshetnikov VV — cloning, mRNA vaccine preparation, manuscript writing; Avdienko VG — experimental procedure (*in vivo* and *ex vivo*), data analysis; Sheverev DV — mRNA vaccine preparation, data analysis; Yermeev VV — study design, data analysis, manuscript writing; Ivanov RA — study design, manuscript writing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Central Tuberculosis Research Institute (protocol № 3/2 dated 11 May 2023) and conducted in accordance with the Order of the Ministry of Health No. 755 and the Guidelines issued by the Office of Laboratory Animal Welfare (A5502-01).

✉ **Correspondence should be addressed:** Galina S. Shepelkova, Jauzskaja alleja, 2, 107564, Moscow, Russia; g.shepelkova@ctri.ru; Vasily V. Reshetnikov, Olimpiyskiy prospekt, 1, Sochi, 354340, Russia; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

**Received:** 17.11.2023 **Accepted:** 19.12.2023 **Published online:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.054

Ежегодно в мире выявляют около 10 млн случаев заболевания активным туберкулезом (ТБ) и около 1,5 млн смертей от него [1]. Поиски новой противотуберкулезной вакцины привели в отчаяние не одно поколение энтузиастов-исследователей. Многочисленные и трудоемкие попытки понять фундаментальные механизмы протективного иммунитета при микобактериальной инфекции привели лишь к осознанию его сложности и не позволили установить надежные иммунологические корреляты протекции и сформировать базу для рационального отбора перспективных вакцин. Ясно, что при разработке вакцин нового поколения необходимо учитывать уникальные особенности эффективного иммунного ответа против соответствующего патогена [2]. Требования к таким вакцинам должны включать: 1) индукцию «правильного» соотношения Т-клеточных субпопуляций и цитокинового спектра при быстрой реакции на заражение в сочетании с индукцией протективного и длительного (иммунологическая память) иммунитета; 2) активацию «правильных» эффекторных механизмов, направленных на предупреждение заражения или элиминацию инфицирующего агента; 3) высокую специфичность в отношении инфицирующего агента во избежание риска аутоагрессии за счет перекрестных антигенов; 4) использование антигенов бактерии, экспрессируемых в хозяине всеми изолятами и штаммами; 5) иммуногенность для всех гаплотипов главного комплекса гистосовместимости (МНС) человеческой популяции.

Важнейшими аспектами для разработки новой эффективной противотуберкулезной вакцины представляются следующие: а) подбор антигенов, их комбинирование и выбор физико-химической природы антигенов (внутриклеточные, ассоциированные с поверхностью или секретлируемые белки, гликолипиды, фосфолипиды); б) тип вакцины (цельные белки или пептиды, цельные живые атенуированные или убитые нагреванием бактерии, рекомбинантные бактерии, ДНК-вакцины); в) форма и способ введения вакцины (высокие/низкие дозы, адъюванты, иммуномодулирующие цитокины, иммуностимулирующие последовательности ДНК).

Применение вакцин на основе мРНК — относительно новое направление вакцинологии [3, 4]. Первые экспериментальные мРНК-вакцины были разработаны в начале 1990-х гг. Показано, что они индуцируют как гуморальный, так и клеточный иммунитет *in vivo* [5, 6]. Однако первые носители, используемые для переноса молекул мРНК, имели неблагоприятные профили безопасности, в то время как использование мРНК *per se* приводило к распознаванию нуклеиновых кислот иммунной системой и деградации РНКазами [6]. Эти проблемы были частично преодолены за счет использования в мРНК-молекуле модифицированных нуклеозидов (замена уридина псевдоуридином или другими аналогами), которые помогают избежать индукции опосредованных интерферонами противовирусных путей, которые приводили к разрушению молекул мРНК [7]. В то же время, опосредованная toll-рецепторами активация механизмов врожденного иммунного ответа молекулами мРНК способна повысить эффективность вакцинации [8]. Разработка носителей в виде липидных наночастиц (содержащих пегилированные липиды, холестерин, ионизируемые липиды и фосфолипиды), характеризующихся улучшенным профилем безопасности, повысила эффективность доставки мРНК. В целом, эти достижения привели к росту и постоянному интересу

к использованию мРНК-вакцин для профилактики различных инфекционных заболеваний, преимущественно вирусной природы. В то же время опыт применения мРНК-вакцин против инфекционных заболеваний, вызванных бактериями, крайне ограничен.

Тем не менее, не все мРНК-препараты высокоэффективны. Низкая стабильность РНК в клетке приводит к преждевременной деградации РНК, низкой эффективности трансляции, снижению уровня и продолжительности экспрессии целевого белка [9]. Одну из ключевых ролей в обеспечении стабильности молекул мРНК и эффективности их трансляции играют регуляторные последовательности нетранслируемых областей (5'-UTR и 3'-UTR). Следует отметить, что, несмотря на активные исследования свойств UTR, число исследований, оценивающих вклад отдельных UTR на трансляцию гетерологичных РНК, ограничено [10, 11]. Цель нашего исследования — изучить иммуногенность и протективную активность противотуберкулезных мРНК-вакцин с различными комбинациями последовательностей 5'-UTR и 3'-UTR в экспериментальной модели на мышах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Экспериментальный дизайн

В эксперименте использовали 65 самок мышей C57BL/6J (B6) и 65 самок мышей I/StSnEgYCit (I/St) весом 20–25 г в возрасте 2–4 месяца из питомника ФГБНУ «ЦНИИТ». Животных содержали в условиях конвенционального вивария при фиксированном световом режиме 12.00 : 12.00 ч и доступом к корму и воде *ad libitum*. Мышей B6 иммунизировали внутримышечно двукратно с интервалом в три недели тремя различными вариантами мРНК-вакцин: mRNA 5'-TPL-Esat6-3'Mod, 5'-Rabb-Esat6-3'EMCV и 5'-Mod-Esat6-3'Mod по 50 мкг РНК на инъекцию (рис. 1). Контрольным животным вводили фосфатный буфер (PBS). Вакцинацию БЦЖ (BCG Pasteur) провели однократно в дозе 100 000 КОЕ/мышь подкожно за пять недель до забора тканей (B6)/инфицирования (I/St).

Восемь животных из каждой группы мышей B6 использовали для оценки гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Оставшихся мышей (пять в каждой группе) использовали для оценки Т-клеточного ответа (ELISpot), а также для оценки титра IgG и IgM к антигенам *M. tuberculosis*. У мышей линии I/St через 50 дней после инфицирования оценивали микобактериальную нагрузку селезенки и легких (пять в каждой группе), а также оценивали динамику гибели мышей после инфицирования.

### Клонирование

С целью получения конструкций для последующей *in vitro* транскрипции РНК в коммерческий вектор pSmart (Lucigen; США) встраивали кассету, содержащую 5'-UTR, 3'-UTR, и последовательность, кодирующую различные эпитопы белка Esat6, которая была описана ранее [12]. В качестве 5'-UTR использовали последовательности 5'-UTR вакцины против SARS-CoV2 фирмы Moderna (США), последовательность трехчастного лидера поздних аденовирусных мРНК (tripartite leader, TPL) или кроличьего β-глобина Rabb (приложение 1). В качестве 3'-UTR использовали последовательность 3'-UTR вакцины против SARS-CoV2 фирмы Moderna или последовательность 3'-UTR вируса энцефаломиокардита EMCV. Фрагменты сшивали

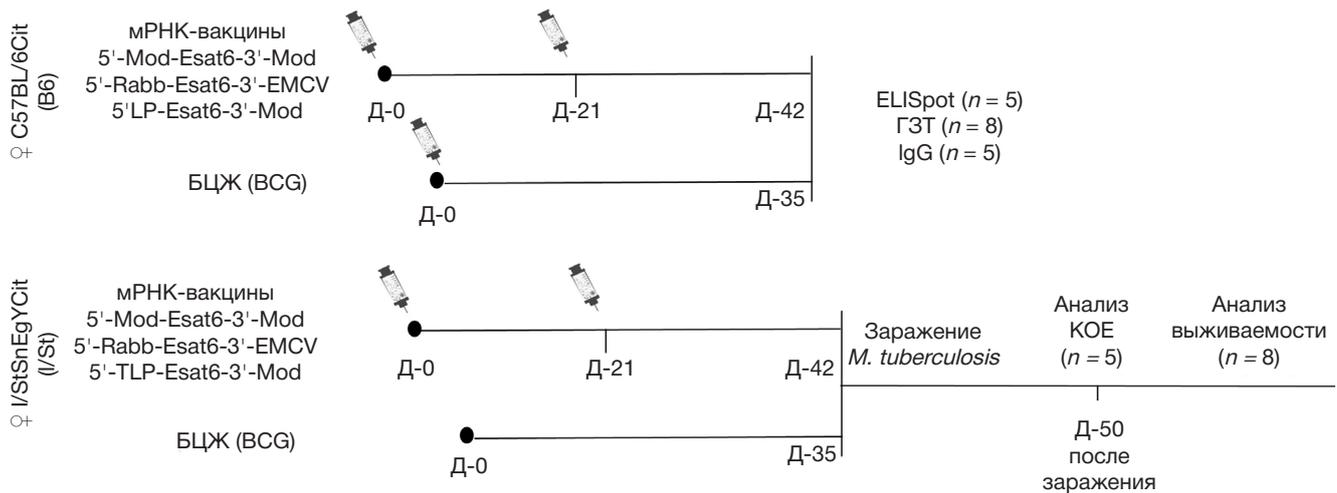


Рис. 1. Экспериментальный дизайн

методом ПЦР с использованием перекрывающихся праймеров. В конструкцию 5'-UTR-Esat6-3'-UTR вводили сайты рестрикции EcoRI и BglII, по которым и осуществляли клонирование в вектор pSmart. Для культивирования использовали штамм NEB-stable (New England Biolabs; UK).

### In vitro транскрипция мРНК

In vitro транскрипцию проводили, как описано ранее [12]. РНК преципитировали добавлением LiCl до концентрации 0,32 М и EDTA (рН 8,0) до концентрации 20 мМ с последующей инкубацией на льду в течение часа. Далее раствор центрифугировали в течение 15 мин (25000 g, 4 °C). Осадок РНК промывали 70%-м этанолом, растворяли в ультраочищенной воде и еще раз преципитировали спиртом по стандартной методике. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм.

### Формуляция мРНК в липидные наночастицы

Формуляцию мРНК в липидные наночастицы проводили на приборе NanoAssemblr™ Benchtop (Precision Nanosystems; США), как описано ранее [13]. Компонентами липидной смеси были ионизируемый липидоид ALC-0315 (BroadPharm; США), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) (Avanti Polar Lipids; США), холестерин (Sigma-Aldrich; США), DMG-PEG-2000 (BroadPharm; США); мольное соотношение (%) составляло 46,3 : 9,4 : 42,7 : 1,6.

Концентрацию загруженной в липидные наночастицы мРНК определяли по разнице значений уровня флуоресцентного сигнала при окрашивании реагентом RiboGreen (Thermo Fischer Scientific; США) суспензии частиц до их разрушения и после. Для разрушения частиц использовали детергент Triton X-100 (Sigma-Aldrich; США). Количество инкапсулированной РНК в частицах во всех образцах было более 95% по отношению к общему количеству РНК (инкапсулированная плюс свободная). Размер частиц составил 80–90 нм, индекс полидисперсности — менее 0,15.

### Измерение реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

Через четыре недели после вакцинации реакцию ГЗТ мышей каждой группы (по восемь мышей) оценивали

по набуханию левой задней лапки мыши в ответ на введение 40 мкл PBS, содержащего 50 МЕ очищенного туберкулина (ФГУП «НЦЭСМП» МЗ РФ; Россия) через 48 ч после инъекции. Данные представлены в виде  $\Delta$  (разность толщины левой и правой лапки в мм).

### Антигены

В качестве антигена в экспериментах ex vivo использовали соникат *M. tuberculosis* H37Rv — растворимую фракцию разрушенных ультразвуком *M. tuberculosis* H37Rv [14].

### Определение титров IgG и IgM к антигенам *M. tuberculosis*

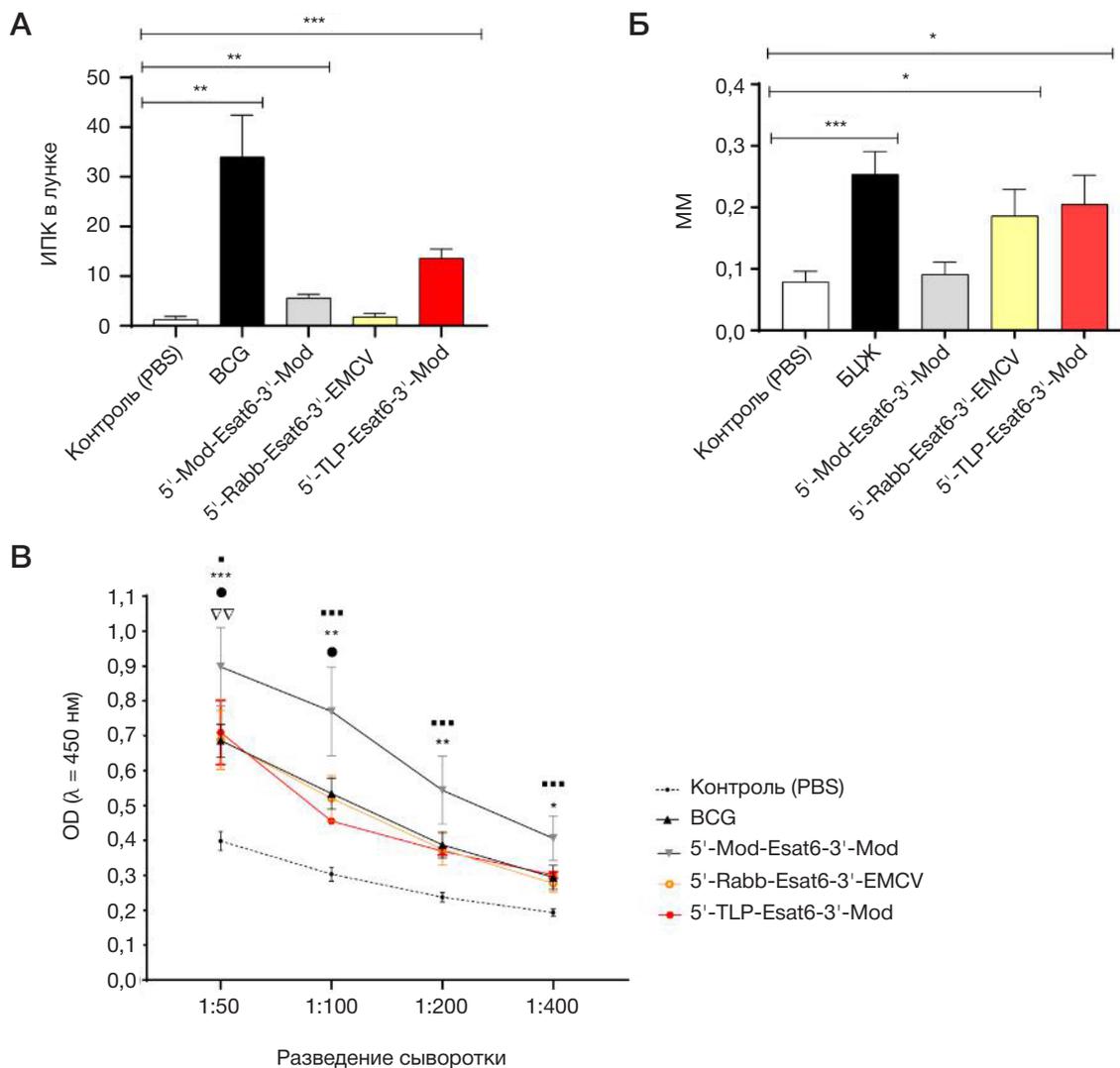
Сыворотку крови мышей использовали для определения титров специфичных антител (IgG и IgM) к микобактериальным антигенам иммуноферментным методом, рутинно применяемым в лаборатории [15, 16]. Для определения антител использовали разведения сыворотки от 1 : 50 до 1 : 400.

### Определение количества IFN $\gamma$ -продуцирующих клеток

Уровень протективного Т-клеточного иммунного ответа оценивали по количеству спленоцитов, секретирующих IFN $\gamma$  в ответ на стимуляцию микобактериальными антигенами, методом ELISpot при помощи наборов Mouse IFN $\gamma$  ELISpot Set (BD NJ; USA) и AEC Substrate Set (BD NJ; USA) в соответствии с рекомендациями изготовителя.

### Оценка протективного ответа

Мышей линии I/St дважды иммунизировали (за 42 и 21 день до инфицирования) мРНК-вакцинными препаратами. Иммунизацию БЦЖ проводили за 35 дней до заражения. Мышей инфицировали вирулентным штаммом *M. tuberculosis* в дозе 500 000 КОЕ/мышь. На 50-й день после заражения определяли количество микобактерий во внутренних органах инфицированных мышей. Для этого стерильно выделяли легкие и селезенки зараженных животных, гомогенизировали в 2 мл физиологического раствора, готовили серийные десятикратные разведения гомогенатов органов и высевали на чашки Петри с агаром Мидлбура 7H10 по 50 мкл на чашку. Чашки Петри с нанесенными суспензиями инкубировали при 37 °C,



**Рис. 2.** Индукция адаптивного иммунного ответа мРНК-вакцинными препаратами. Мышей линии В6 дважды иммунизировали (за 42-й и 21-й дни до эксперимента) мРНК-вакцинными препаратами. Иммунизацию БЦЖ проводили за 35 дней до эксперимента. В день эксперимента определяли количество ИПК в отвечающих на микобактериальные антигены (А), развитие реакции ГЗТ (Б) и продукцию специфических антител к антигенам микобактерий (В). Представлены средние значения  $\pm$ SEM, где  $n$  — пять мышей в группе для А и В, восемь мышей в группе для Б. А и Б. \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$  по сравнению с контролем. В. \* — достоверное отличие от контроля для вакцины BCG,  $\Delta$  — достоверное отличие от контроля для вакцины 5'-Mod-Esat6-3'-Mod,  $\bullet$  — достоверное отличие от контроля для вакцины 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV,  $\blacksquare$  — достоверное отличие от контроля для вакцины 5'-TLP-Esat6-3'-Mod

через 21 день подсчитывали количество макроколоний *M. tuberculosis* H37Rv на чашке и пересчитывали их количество на орган.

### Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента, применяя поправку Бонферрони при сравнении более двух групп. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . Данные на рисунках приведены как средние значения  $\pm$  SEM. Для кривых выживания использовали Гехан–Бреслоу–Уилкоксон-тест.

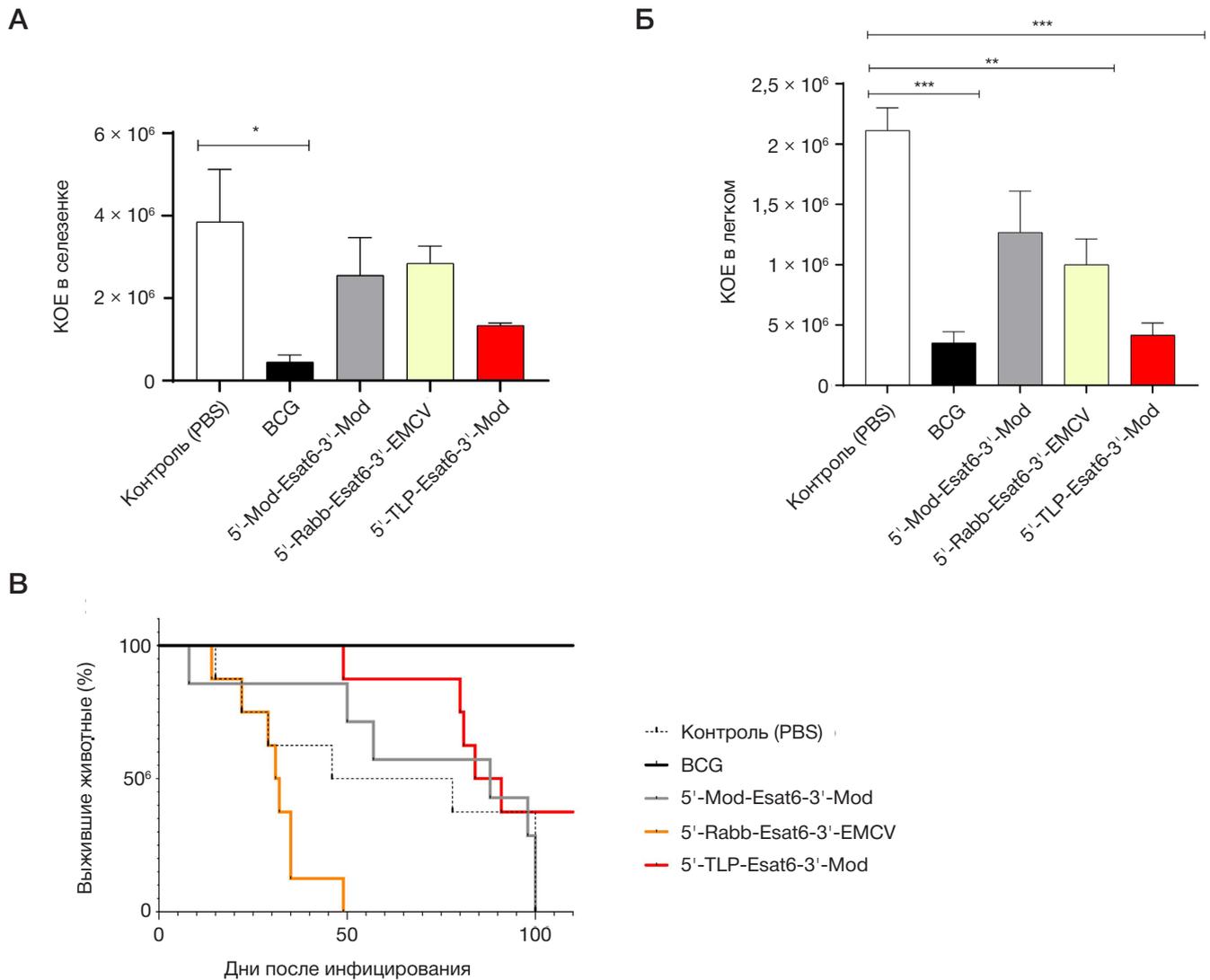
### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуногенность тестируемых вакцин оценивали по их способности индуцировать специфичный клеточный иммунный ответ *ex vivo* (ELIspot) и *in vivo* (ГЗТ), а также специфичный антительный ответ в крови провакцинированных мышей (рис. 2). На рис. 2А представлены результаты определения количества IFN $\gamma$  продуцирующих клеток (ИПК) в селезенках

экспериментальных животных. Достоверные различия с контролем получены для мРНК вакцины 5'-Mod-Esat6-3'-Mod и 5'-TLP-Esat6-3'-Mod ( $p < 0,004$  и  $p < 0,0008$  соответственно). Среди групп животных, проиммунизированных мРНК-вакцинами, по количеству ИПК лидировала группа, получившая 5'-TLP-Esat6-3'-Mod ( $p < 0,004$  и  $p < 0,0004$  в сравнении с мРНК-вакцинами 5'-Mod-Esat6-3'-Mod, 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV соответственно). В то же время максимальное количество ИПК определялось в группе мышей, провакцинированных БЦЖ ( $p < 0,006$ ,  $p < 0,006$  и  $p < 0,03$  в сравнении с мРНК-вакцинами 5'-Mod-Esat6-3'-Mod, 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV и 5'-TLP-Esat6-3'-Mod соответственно).

Развитие реакции ГЗТ достоверно отличалось от контроля в случае иммунизации мышей мРНК-вакциной 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV и 5'-TLP-Esat6-3'-Mod ( $p < 0,04$  для данных групп) и были аналогичны данным, полученным в группе мышей В6, провакцинированных БЦЖ (рис. 2Б). Достоверных различий между группами 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV, 5'-TLP-Esat6-3'-Mod и БЦЖ получено не было.

Исследования формирования гуморального иммунного ответа к мРНК-противотуберкулезным вакцинным



**Рис. 3.** Формирование протективного ответа при иммунизации мРНК-вакцинами. Мышей линии I/St дважды иммунизировали (за 42 и 21 день до инфицирования) мРНК-вакцинными препаратами. Иммунизацию БЦЖ проводили за 35 дней до заражения. Мышей инфицировали вирулентным штаммом *M. tuberculosis* в дозе 500 000 КОЕ/мышь. Через 50 дней после инфицирования оценивали микобактериальную нагрузку селезенки (**А**) и легких (**Б**) инфицированных животных, а также оценивали динамику гибели мышей после инфицирования (**В**). Представлены средние значения  $\pm$ SEM, где  $n$  — пять (**А, Б**) и восемь (**В**) мышей в группе; \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$

препаратам также продемонстрировали различия с контролем. Результаты определения (кривые титрования) АГ-специфичных антител класса IgG представлены на рис. 2В. Все протестированные вакцины, включая БЦЖ, стимулировали продукцию антимикобактериального IgG у проиммунизированных мышей. При этом максимальная выработка АГ-специфичных IgG среди мРНК-вакцин отмечена в ответ на иммунизацию 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV и 5'-TLP-Esat6-3'-Mod (в сравнении с контролем). Между группами 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV, 5'-TLP-Esat6-3'-Mod и БЦЖ достоверных различий получено не было. Уровни продукции АГ-специфичного IgM у вакцинированных мышей не отличались от контрольных (приложение 2). Таким образом, наши результаты показали, что мРНК-вакцины на основе эпитопов Esat6 приводят к индукции адаптивного иммунного ответа. Несмотря на то что все варианты мРНК-вакцин были менее эффективны, чем БЦЖ, мы наблюдали выраженную разницу в их эффективности в зависимости от последовательностей UTR. Наилучшие результаты при использовании вакцины как в тестах на клеточный, так и гуморальный ответ мы наблюдали у мРНК-вакцины 5'-TLP-Esat6-3'-Mod.

Исследование развития протективного ответа проводили на мышах I/St, чувствительных к туберкулезной инфекции. На рис. 3 представлены результаты определения микобактериальной нагрузки инфицированных животных, а также динамика гибели проиммунизированных мышей после заражения. Достоверное снижение количества микобактерий в легочной ткани в сравнении с невакцинированным контролем было выявлено у мышей, проиммунизированных мРНК-вакцинами 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV, 5'-TLP-Esat6-3'-Mod и БЦЖ (рис. 3Б). Причем микобактериальная нагрузка легочной ткани в группах мышей, провакцинированных мРНК-вакциной 5'-TLP-Esat6-3'-Mod и БЦЖ, достоверно не различалась. В селезенке достоверные отличия от неиммунизированного контроля получены только для мышей, провакцинированных БЦЖ (рис. 3А).

Один из основных критериев наличия протективного действия вакцины — увеличение времени жизни животных после инфицирования, поэтому мы сравнили динамику гибели контрольной и экспериментальных групп мышей после заражения. Достоверные отличия от невакцинированного контроля (Гехан-Бреслоу—

Уилкоксон–тест для кривых выживания) были получены для мышей, иммунизированных БЦЖ и мРНК-вакциной 5'-TPL-Esat6-3'-Mod ( $p = 0,0005$  и  $p = 0,04$  соответственно). Также были показаны достоверные различия в динамике гибели мышей I/St, вакцинированных БЦЖ и мРНК-вакциной 5'-TPL-Esat6-3'-Mod ( $p = 0,01$ ) (рис. 3В). Аналогично результатам по индукции адаптивного ответа, мРНК вакцина 5'-TPL-Esat6-3'-Mod показала наилучшие результаты по эффективности среди мРНК-вакцин; лишь она обеспечила снижение смертности по сравнению с невакцинированными животными.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании на модели туберкулезной инфекции у мышей мы показали, что двукратное введение мРНК-вакцин, состоящих из заключенной в липидные частицы кодирующей ряд эпитопов микобактериального белка ESAT6 мРНК, генерирует протективный иммунный ответ, эффективность которого зависит, в том числе, от использованных в составе вакцины нетранслируемых последовательностей мРНК. При этом уровень стимуляции гуморального иммунного ответа разными вариантами вакцины, определяемый по интенсивности продукции специфических антител после вакцинации, существенно отличается от уровня активации клеточного иммунитета, регистрируемого по интенсивности реакций ГЗТ и продукции IFN $\gamma$  (по данным ELISpot).

Исторически сложилось, что при изучении иммунологического ответа на инфекцию, вызванную *M. tuberculosis*, основное внимание уделяли Т-клеткам и макрофагам, поскольку их роль в формировании гранулемы была достаточно полно охарактеризована. В отличие от этого, роль В-клеток в патофизиологии туберкулезной инфекции была изучена относительно мало. Соответственно, большинство разработанных новых противотуберкулезных вакцин сосредоточено на индукции клеточного иммунного ответа [2]. Однако в ряде недавних исследований эффективности противотуберкулезных вакцин на мышах, нечеловекообразных приматах и людях показана значительная индукция антител против *M. tuberculosis*, что может быть связано с наблюдаемой эффективностью вакцин [17]. В настоящем исследовании максимальная протекция (по результатам высеваания микобактерий из легких и выживания мышей после заражения) среди всех мРНК-вакцин достигнута при использовании мРНК-вакцины 5'-TPL-Esat6-3'-Mod. Иммунизация мРНК-вакциной 5'-TPL-Esat6-3'-Mod приводит к формированию выраженного клеточного иммунного ответа и умеренному уровню продукции специфических антимикобактериальных IgG-антител. В то же время иммунизация мышей мРНК-вакциной 5'-Mod-Esat6-3'-Mod стимулирует активную выработку специфических антител, но не сопровождается генерацией защиты и не активирует клеточный компонент адаптивного иммунного ответа.

Мы предполагаем, что различия между тремя мРНК-вакцинами, отличающимися только нетранслируемыми последовательностями, могут быть связаны с длительностью и интенсивностью трансляции мРНК и соответственно различной эффективностью презентации антигенов. Последовательность трехчастного лидера аденовирусов (TPL) действует как энхансер трансляции мРНК вирусных поздних генов и, как полагают, обладает способностью инициировать трансляцию поздних аденовирусных мРНК кэп-независимым способом [18, 19]. Последовательность 5'-UTR TPL состоит из 245 нуклеотидов и имеет сложную вторичную структуру. Показано, что TPL содержит IRES, благодаря которому он способен рекрутировать рибосому независимо от взаимодействия с кэпом [18, 19]. Однако, поскольку независимая от кэпа инициация трансляции активируется только в условиях клеточного стресса, мы предполагаем, что наши результаты по TPL не связаны с инициацией трансляции, независимой от кэпа. Помимо большей длины, последовательность TPL имеет более высокое содержание GC и сильно отрицательную минимальную свободную энергию Гибса ( $\Delta G$ ), что связано с ингибированием трансляции [20]. Напротив, 5'-UTR кроличьего  $\beta$ -глобина (Rabb) и 5'-UTR из вакцины мРНК-1273 (Moderna) имеют длину около 50 нуклеотидов и не содержат сильных вторичных структур [21]. По-видимому, вторичные структуры в 5'-UTR, возникающие без участия РНК-связывающих белков, не оказывают выраженного ингибирующего действия на трансляцию, поскольку могут раскручиваться непосредственно перед инициацией трансляции с помощью фактора eIF4A [22]. В то же время сильная вторичная структура TPL может способствовать привлечению РНК-связывающих белков, которые оказывают позитивное влияние на трансляцию.

Таким образом, наиболее перспективным для дальнейших исследований выглядит мРНК-вакцина 5'-TPL-Esat6-3'-Mod. Несмотря на то что она уступает БЦЖ, дальнейшая оптимизация, включающая увеличение дозы препарата, кэпа или использование аналогов уридина могут повысить ее эффективность. Следующим этапом тестирования мРНК-вакцины 5'-TPL-Esat6-3'-Mod может стать оценка перспективности ее использования для ревакцинации после первичной вакцинации БЦЖ.

## ВЫВОДЫ

Мультиэпитопные вакцины на основе мРНК можно рассматривать в качестве самостоятельной профилактической вакцины, а также в качестве бустерной вакцины против *M. tuberculosis*. Несмотря на то что эффективность исследованных вариантов вакцины ниже, чем у БЦЖ, была выявлена зависимость эффективности от последовательности регуляторных регионов. Наши результаты позволили установить оптимальную комбинацию регуляторных элементов экспрессионной кассеты. Дальнейшая разработка мРНК-вакцины против *M. tuberculosis* будет направлена на увеличение ее эффективности.

## Литература

1. Global tuberculosis report, 2023.
2. Lai R, Ogunola AF, Rakib T, Behar SM. Key advances in vaccine development for tuberculosis-success and challenges. NPJ vaccines. 2023; 8: 158. DOI: 10.1038/s41541-023-00750-7.
3. Self WH, Tenforde MW, Rhoads JP, Gaglani M, Ginde AA, Douin DJ, et al. Comparative Effectiveness of Moderna, Pfizer-BioNTech, and Janssen (Johnson & Johnson) Vaccines in Preventing COVID-19 Hospitalizations Among Adults Without Immunocompromising Conditions — United States, March–August 2021. MMWR. Morbidity and mortality weekly report. 2021; 70: 1337–43, DOI: 10.15585/mmwr.mm7038e1.
4. Melo A, de Macedo LS, Invencao M, de Moura IA, da Gama M,

- de Melo CML, et al. Third-generation vaccines: features of nucleic acid vaccines and strategies to improve their efficiency. *Genes*. 2022; 13. DOI:10.3390/genes13122287.
5. Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, Magne R, Gomard E, Guillet JG, et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *European journal of immunology*. 1993; 23: 1719–22, DOI: 10.1002/eji.1830230749.
  6. Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, Sumerel L, Pike MJ, Johanning F, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer research*. 1995; 55: 1397–400.
  7. Anderson BR, Muramatsu H, Jha BK, Silverman RH, Weissman D, Kariko K. Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L. *Nucleic acids research*. 2011; 39: 9329–38. DOI: 10.1093/nar/gkr586.
  8. Muslimov A, Tereshchenko V, Shevyrev D, Rogova A, Lepik K, Reshetnikov V, et al. The dual role of the innate immune system in the effectiveness of mRNA therapeutics. *International journal of molecular sciences*. 2023; 24. DOI: 10.3390/ijms241914820.
  9. Weng Y, Li C, Yang T, Hu B, Zhang M, Guo S, et al. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnology advances*. 2020; 40: 107534. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107534.
  10. Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, Plaschke A, Kranz LM, Fesser S, et al. Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2019; 27: 824–36. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.12.011.
  11. Cao J, Novoa EM, Zhang Z, Chen WCW, Liu D, Choi GCG, et al. High-throughput 5' UTR engineering for enhanced protein production in non-viral gene therapies. *Nature communications*. 2021; 12: 4138. DOI: 10.1038/s41467-021-24436-7.
  12. Vasileva O, Tereshchenko TV, Krapivin B, Muslimov A, Kukushkin I, Pateev I, et al. Immunogenicity of full-length and multi-epitope mRNA vaccines for M. Tuberculosis as demonstrated by the intensity of T-cell response: a comparative study in mice. *Bulletin of RSMU*. 2023; 03: 42–48. DOI: 10.24075/brsmu.2023.021.
  13. Kirshina AS, Kazakova AA, Kolosova ES, Imasheva EA, Vasileva OO, Zaborova OV, et al. Effects of various mRNA-LNP vaccine doses on neuroinflammation in BALB/c mice. *Bulletin of RSMU*. 2022; 6. DOI: 10.24075/brsmu.2022.068.
  14. Avdienko VG, Babaian SS, Guseva AN, Kondratiuk NA, Rusakova LI, Averbakh MM, et al. Quantitative, spectral, and serodiagnostic characteristics of antimycobacterial IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh*. 2006; 47–55.
  15. Nikonenko BV, Apt AS, Mezhlumova MB, Avdienko VG, Yeremeev VV, Moroz AM. Influence of the mouse Bcg, Tbc-1 and xid genes on resistance and immune responses to tuberculosis infection and efficacy of bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination. *Clinical and experimental immunology*. 1996; 104: 37–43, DOI: 10.1046/j.1365-2249.1996.d01-643.x.
  16. Kozlova IV, Avdienko VG, Babayan SS, Andrievskaya Yu, Gergert VY. Diagnosis of Bactec samples by immunoglobulins of mouse hyperimmune sera obtained against modified antigens of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2019; 97: 25–30.
  17. Rijnink WF, Ottenhoff THM, Joosten SA. B-Cells and Antibodies as Contributors to Effector Immune Responses in Tuberculosis. *Frontiers in immunology*. 2021; 12: 640168. DOI: 10.3389/fimmu.2021.640168.
  18. Logan J, Shenk T. Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984; 81: 3655–9. DOI: 10.1073/pnas.81.12.3655.
  19. Kaufman RJ. Identification of the components necessary for adenovirus translational control and their utilization in cDNA expression vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82: 689–93. DOI: 10.1073/pnas.82.3.689.
  20. Sample PJ, Wang B, Reid DW, Presnyak V, McFadyen IJ, Morris DR, et al. Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay. *Nature biotechnology*. 2019; 37: 803–9. DOI: 10.1038/s41587-019-0164-5.
  21. Kozak M. Features in the 5' non-coding sequences of rabbit alpha and beta-globin mRNAs that affect translational efficiency. *Journal of molecular biology*. 1994; 235: 95–110. DOI: 10.1016/s0022-2836(05)80019-1.
  22. Kumari S, Bugaut A, Huppert JL, Balasubramanian S. An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nature chemical biology*. 2007; 3: 218–21. DOI: 10.1038/nchembio864.

## References

1. Global tuberculosis report, 2023.
2. Lai R, Ogunsola AF, Rakib T, Behar SM. Key advances in vaccine development for tuberculosis-success and challenges. *NPJ vaccines*. 2023; 8: 158. DOI: 10.1038/s41541-023-00750-7.
3. Self WH, Tenforde MW, Rhoads JP, Gaglani M, Ginde AA, Douin DJ, et al. Comparative Effectiveness of Moderna, Pfizer-BioNTech, and Janssen (Johnson & Johnson) Vaccines in Preventing COVID-19 Hospitalizations Among Adults Without Immunocompromising Conditions — United States, March–August 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. 2021; 70: 1337–43, DOI: 10.15585/mmwr.mm7038e1.
4. Melo A, de Macedo LS, Invencao M, de Moura IA, da Gama M, de Melo CML, et al. Third-generation vaccines: features of nucleic acid vaccines and strategies to improve their efficiency. *Genes*. 2022; 13. DOI:10.3390/genes13122287.
5. Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, Magne R, Gomard E, Guillet JG, et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *European journal of immunology*. 1993; 23: 1719–22, DOI: 10.1002/eji.1830230749.
6. Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, Sumerel L, Pike MJ, Johanning F, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer research*. 1995; 55: 1397–400.
7. Anderson BR, Muramatsu H, Jha BK, Silverman RH, Weissman D, Kariko K. Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L. *Nucleic acids research*. 2011; 39: 9329–38. DOI: 10.1093/nar/gkr586.
8. Muslimov A, Tereshchenko V, Shevyrev D, Rogova A, Lepik K, Reshetnikov V, et al. The dual role of the innate immune system in the effectiveness of mRNA therapeutics. *International journal of molecular sciences*. 2023; 24. DOI: 10.3390/ijms241914820.
9. Weng Y, Li C, Yang T, Hu B, Zhang M, Guo S, et al. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnology advances*. 2020; 40: 107534. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107534.
10. Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, Plaschke A, Kranz LM, Fesser S, et al. Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2019; 27: 824–36. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.12.011.
11. Cao J, Novoa EM, Zhang Z, Chen WCW, Liu D, Choi GCG, et al. High-throughput 5' UTR engineering for enhanced protein production in non-viral gene therapies. *Nature communications*. 2021; 12: 4138. DOI: 10.1038/s41467-021-24436-7.
12. Vasileva O, Tereshchenko TV, Krapivin B, Muslimov A, Kukushkin I, Pateev I, et al. Immunogenicity of full-length and multi-epitope mRNA vaccines for M. Tuberculosis as demonstrated by the intensity of T-cell response: a comparative study in mice. *Bulletin of RSMU*. 2023; 03: 42–48. DOI: 10.24075/brsmu.2023.021.
13. Kirshina AS, Kazakova AA, Kolosova ES, Imasheva EA, Vasileva OO, Zaborova OV, et al. Effects of various mRNA-LNP vaccine doses on neuroinflammation in BALB/c mice. *Bulletin of RSMU*. 2022; 6. DOI: 10.24075/brsmu.2022.068.
14. Avdienko VG, Babaian SS, Guseva AN, Kondratiuk NA, Rusakova LI, Averbakh MM, et al. Quantitative, spectral, and serodiagnostic characteristics of antimycobacterial IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh*. 2006; 47–55.

- characteristics of antimycobacterial IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh*. 2006; 47–55.
15. Nikonenko BV, Apt AS, Mezhlumova MB, Avdienko VG, Yeremeev VV, Moroz AM. Influence of the mouse Bcg, Tbc-1 and xid genes on resistance and immune responses to tuberculosis infection and efficacy of bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination. *Clinical and experimental immunology*. 1996; 104: 37–43. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1996.d01-643.x.
  16. Kozlova IV, Avdienko VG, Babayan SS, Andrievskaya IYu, Gergert VY. Diagnosis of Bactec samples by immunoglobulins of mouse hyperimmune sera obtained against modified antigens of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2019; 97: 25–30.
  17. Rijnink WF, Ottenhoff THM, Joosten SA. B-Cells and Antibodies as Contributors to Effector Immune Responses in Tuberculosis. *Frontiers in immunology*. 2021; 12: 640168. DOI: 10.3389/fimmu.2021.640168.
  18. Logan J, Shenk T. Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984; 81: 3655–9. DOI: 10.1073/pnas.81.12.3655.
  19. Kaufman RJ. Identification of the components necessary for adenovirus translational control and their utilization in cDNA expression vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82: 689–93. DOI: 10.1073/pnas.82.3.689.
  20. Sample PJ, Wang B, Reid DW, Presnyak V, McFadyen IJ, Morris DR, et al. Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay. *Nature biotechnology*. 2019; 37: 803–9. DOI: 10.1038/s41587-019-0164-5.
  21. Kozak M. Features in the 5' non-coding sequences of rabbit alpha and beta-globin mRNAs that affect translational efficiency. *Journal of molecular biology*. 1994; 235: 95–110. DOI: 10.1016/s0022-2836(05)80019-1.
  22. Kumari S, Bugaut A, Huppert JL, Balasubramanian S. An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nature chemical biology*. 2007; 3: 218–21. DOI: 10.1038/nchembio864.

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНГИБИТОРА РИБОНУКЛЕАЗ В *E. COLI* ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СИНТЕЗЕ мРНК *IN VITRO*

М. В. Захарова<sup>1</sup>, А. А. Загоскин<sup>1,2</sup>, Р. А. Иванов<sup>2</sup>, М. О. Нагорных<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Российской академии наук, Пущино, Россия

<sup>2</sup> Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

Технологии, лежащие в основе получения синтетических мРНК *in vitro*, значительно расширили возможности их исследовательского и терапевтического применения. Флагманской областью применения стала ниша мРНК-вакцин, однако этот класс терапевтических молекул может быть применим к гораздо более широкому кругу задач. В основе процесса получения искусственных молекул РНК лежит реакция ферментативного синтеза *in vitro*, одним из компонентов которой является ингибитор рибонуклеаз. Этот белок необходим для защиты синтезированных РНК от атак рибонуклеаз с целью предотвращения деградации молекул, что критично для РНК. Чаще всего используют ингибитор рибонуклеаз эукариотического происхождения, полученный в виде рекомбинантного белка в клетках бактерий *E. coli*. Однако он является сложной мишенью для наработки в бактериях, что обусловлено его структурой. Целью работы было проверить наработку рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз в различных штаммах *E. coli*, а также показать влияние хелперных полипептидов и клеточных шаперонов на этот процесс. При помощи подходов генной инженерии были сконструированы плазмиды, с которых проводили наработку химерных молекул ингибитора рибонуклеаз и вспомогательных полипептидов. Оценку вклада различных компонентов, влияющих на растворимость целевого рекомбинантного белка, проводили в ходе денситометрического анализа результатов электрофореза в ПААГ. Определили, что комбинации вектора с сильным промотором для экспрессии гена ингибитора рибонуклеазы *RNH1* и вспомогательных полипептидов MBP и TIG на фоне повышенной экспрессии клеточных шаперонов *dnaK*, *dnaJ*, *grpE* дают выход целевого продукта 45 мг/л и 60 мг/л соответственно. Подобранные условия дают возможность крупномасштабных наработок этого белка для дальнейшего использования в синтезе РНК *in vitro* при производстве терапевтических препаратов.

**Ключевые слова:** ингибитор рибонуклеаз, продукция рекомбинантных белков, шапероны, вспомогательные полипептиды

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке программы Министерства высшего образования и науки РФ (соглашение №. 075-10-2021-113, уникальный номер проекта RF----193021X0001).

**Вклад авторов:** М. В. Захарова — подбор условий наработки рекомбинантных белков, эксперименты по наработке в разных штаммах *E. coli*; А. А. Загоскин — хроматографическая очистка рекомбинантных белков; М. О. Нагорных — концепция работы, создание генетических конструкций, написание статьи; Р. А. Иванов — общее руководство.

✉ **Для корреспонденции:** Максим Олегович Нагорных  
Проспект Науки, д. 5, г. Пущино, 142290, Россия; derbanner@gmail.com

**Статья получена:** 16.11.2023 **Статья принята к печати:** 17.12.2023 **Опубликована онлайн:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.058

## PREPARATION OF A RECOMBINANT RIBONUCLEASE INHIBITOR IN *E. COLI* FOR USE IN mRNA SYNTHESIS *IN VITRO*

Zakharova MV<sup>1</sup>, Zagoskin AA<sup>1,2</sup>, Ivanov RA<sup>2</sup>, Nagornykh MO<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

<sup>2</sup> Sirius University of Science and Technology, Sirius, Sochi, Russia

Technologies underlying the production of synthetic mRNAs *in vitro* have significantly expanded the possibilities for research and therapeutic use of this class of molecules. The flagship application area has been the niche of mRNA vaccines, but this class of therapeutic molecules has the potential to be applied in a much broader range of situations. The process of *in vitro* production of artificial RNA molecules is based on an enzymatic synthesis reaction, one of the components of which is a ribonuclease inhibitor. This protein protects synthesized RNA from attacks by ribonucleases and prevents degradation of the molecules, which is critically important for RNA. Eukaryotic ribonuclease inhibitor synthesized as a recombinant protein in the cells of *E. coli* bacteria is the most common choice. However, the structure of this protein makes it a difficult product to make in bacteria. This study aimed to test the production of a recombinant ribonuclease inhibitor in various strains of *E. coli*, and to show the effect that helper polypeptides and cellular chaperones have on this process. Using genetic engineering approaches, we constructed plasmids, from which chimeric ribonuclease inhibitor molecules and helper polypeptides were produced. The influence of various components on solubility of the target recombinant protein was assessed with the help of densitometry, to which we have subjected products of the PAGE electrophoresis. It was determined that combinations of a vector with a strong promoter for the expression of the *RNH1* ribonuclease inhibitor gene and helper polypeptides MBP and TIG against the background of increased expression of cellular chaperones *dnaK*, *dnaJ*, *grpE* give the target product yield of 45 mg/l and 60 mg/l, respectively. The selected conditions allow large-scale production of this protein for further use in *in vitro* RNA synthesis in the context of production of medicines.

**Keywords:** ribonuclease inhibitor, production of recombinant proteins, chaperones, fusion polypeptides

**Funding:** the study was financially supported in the context of the program of Ministry of higher education and science of the Russian Federation (agreement #075-10-2021-113, unique project number RF----193021X0001).

**Author contribution:** Zakharov MV — selection of conditions of production of recombinant proteins, production experiments in different *E. coli* strains; Zagoskin AA — chromatographic clearing of recombinant proteins; Nagornykh MO — conceptualization, design of genetic constructs, article authoring; Ivanov RA — general management.

✉ **Correspondence should be addressed:** Maxim O. Nagornykh  
Prospekt Nauki, 5, Pushchino, 142290, Russia; derbanner@gmail.com

**Received:** 16.11.2023 **Accepted:** 17.12.2023 **Published online:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.058

Ингибитор рибонуклеаз, кодируемый геном *RNH1*, — это белок, экспрессируемый в цитозоль, который ингибирует рибонуклеазы панкреатического типа, образуя с ними комплексы и защищая клеточную РНК от преждевременной деградации [1, 2]. Ингибирование происходит за счет нековалентного связывания белковых молекул рибонуклеаз, что приводит к блокированию как РНК-связывающих, так и каталитических доменов рибонуклеаз [3]. Ингибитор рибонуклеаз довольно консервативный белок, со степенью гомологии свыше 70% у таких млекопитающих, как человек, мышь, лошадь и свинья. В состав ингибитора рибонуклеаз входят 15–16 лейцин-богатых повторов (число повторов зависит от вида млекопитающего), причем каждый повтор включает в себя 28–29 аминокислот, имеет одну альфа спираль и один бета-лист. Повторы организованы в подковообразную структуру, общий молекулярный вес которой равен приблизительно 50 кДа [4, 5]. По своим физико-химическим характеристикам ингибитор рибонуклеаз является кислым белком с изоэлектрической точкой в районе 4,5. Еще одна важная особенность ингибитора рибонуклеаз — наличие 32 остатков цистеина, которые нужны для функционирования фермента. В нативном белке цистеины находятся в восстановленном состоянии, участвуя в образовании гидрофобного ядра белка. При окислении остатков цистеина происходит образование дисульфидных мостиков между остатками цистеина и ингибитор рибонуклеаз теряет свою активность в следствии конформационных изменений [6, 7].

Белковые препараты ингибитора рибонуклеаз имеют важное биотехнологическое значение как для лабораторного использования в исследовательской работе (синтез РНК *in vitro*, трансляция *in vitro*, получение кДНК), так и при масштабном получении терапевтических средств на основе искусственных молекул РНК, поэтому с момента его открытия были предприняты попытки получения этого фермента в больших количествах. Исторически первыми опробованы подходы, основанные на получении ингибитора рибонуклеаз из тканей млекопитающих [8]. С развитием технологий рекомбинантных ДНК пытались получать большие количества ингибитора рибонуклеаз в наиболее широко используемой бактериальной системе на основе *E. coli*. Однако рекомбинантный ингибитор рибонуклеаз склонен к агрегации в *E. coli*, как и другие белки с большим количеством гидрофобных аминокислот, в частности с цистеиновыми остатками. Ряд других факторов, в том числе высокая скорость трансляции, сопряженная с транскрипцией у бактерий, приводят к накоплению подобных рекомбинантных белков в виде телец включения, сформированных из агрегатов неправильно свернутых белковых молекул [9]. Таким образом, ранние попытки получения функционально активного ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме в *E. coli* часто заканчивались тем, что весь белок скапливался в виде неактивных агрегатов, а при попытке провести процесс рефолдинга *in vitro* полученный белок чаще всего терял свою активность и выход белка был очень низким [10].

Для преодоления этой проблемы были разработаны различные подходы. Один из них заключается в использовании для экспрессии гена ингибитора рибонуклеаз вектора со слабым промотором (например, *P<sub>trp</sub>*) и минимальной среды. При таких условиях, существенно снижающих уровень экспрессии гена целевого белка, удалось получить значительные количества рекомбинантного ингибитора в растворимой форме,

однако общий уровень конечного продукта оказался существенно меньшим по сравнению с экспрессионными системами, где целевой ген находится под контролем T7 промотора [2]. Другой подход включает в себя добавление в культуральную среду ДТТ (дитиотреитол), в результате чего цистеины находятся в восстановленном состоянии, а это положительно сказывается на фолдинге многих белков, склонных к агрегации, в частности ингибитора рибонуклеаз [11]. В качестве развития такого подхода помимо добавления восстановителя в виде ДТТ было предложено проводить культивирование в анаэробных условиях при пониженной температуре и с коэкспрессией клеточного шаперона GroEL. Эти меры позволяют получать продукцию ингибитора рибонуклеаз на довольно высоком уровне [12]. Однако такой прием представляется довольно сложным и требует большого количества дополнительных компонентов, что усложняет технологический процесс при крупных наработках белка. Наконец, еще один подход основан на получении целевого продукта в виде химерной молекулы со вспомогательным полипептидом, повышающим растворимость целевого белка. Ранее было показано, что вспомогательный полипептид MBP положительно влияет на наработку ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме в *E. coli* [4].

Целью настоящей работы является подбор условий наработки рекомбинантного человеческого ингибитора рибонуклеаз в *E. coli*, облегчающих технологию получения этого белка в лабораторном и полупромышленном масштабе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Конструирование плазмид

Генетические конструкции, используемые в этой работе, были получены с использованием рестриктазно-лигазного метода клонирования ДНК. Последовательность ДНК гена *RNH1*, кодирующую ингибитор рибонуклеаз человека, синтезировали *de novo* с проведением кодон-оптимизации для *E. coli* (IDT, <https://www.idtdna.com/>). Амплификацию всех последовательностей ДНК в этой работе проводили с использованием высокоточной полимеразы Q5, согласно протоколу производителя (NEB). Клонирование гена ингибитора рибонуклеаз в набор векторов со вспомогательными полипептидами на основе pET28a (Novagen; США) и pSol (Lucigen; США) проводили по сайтам рестрикции NdeI и NotI в ферментативной реакции с двумя соответствующими эндонуклеазами рестрикции («Сибэнзим»; Россия) в течение 1 ч при 37 °С. Далее проводили электрофорез в агарозном геле с последующей очисткой ДНК фрагментов из агарозного геля, с использованием коммерческого набора GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo; США). Очищенные фрагменты ДНК, соответствующие векторной части и гену ингибитора рибонуклеаз, использовали в реакции лигирования с ферментом T4-ДНК-лигазой (NEB) в течение 30 мин при комнатной температуре. Трансформировали компетентные клетки *E. coli* 10G (Lucigen; США) при помощи электропорации (Bio-Rad; США) по протоколу производителя прибора. Из клонов, содержащих корректные вставки, выделяли плазмидную ДНК и подтверждали корректность в реакции секвенирования по методу Сэнгера.

### Нарботка рекомбинантных белков в *E. coli*

Нарботку белков проводили в следующих штаммах, предназначенных для наработки рекомбинантных белков

в *E. coli*: BL21 (DE3) (Invitrogen; США); KRX (Promega; США); Rosetta (DE3) pLysS (Novagen; США); BL21 Star (DE3) (Invitrogen; США), Origami 2 (DE3) (Novagen; США). Так, плазмидами, содержащими комбинация генов вспомогательных полипептидов и ингибитора рибонуклеаз, трансформировали каждый штамм при помощи электропорации и засеивали трансформационной смесью (100 мкл) жидкую среду LB в пробирках (3–5 мл) с селективными антибиотиками. Инкубировали в течение 12–14 ч при 37 °С и перемешивании в режиме 180 об./мин. Далее пересеивали выросшую культуру в соотношении 1 : 200 в пробирки или колбы, содержащие требуемое количество культуральной среды LB (10–500 мл) с селективными антибиотиками. Нарращивали клеточную культуру до оптической плотности OD = 0,5–0,6 на шейкере при 180 об./мин на 37 °С. После достижения нужной оптической плотности охлаждали культуру на льду 10 мин, добавляли индуктор 1 мМ ИПТГ (в случае векторов на основе pET28a) либо 0,2% L-рамнозы (в случае векторов на основе pSol), инкубировали при разных температурах (16 °С и 37 °С) и перемешивании 120 об./мин в течение 10 ч (16 °С) либо 2 ч (37 °С). В случаях дополнительной коэкспрессии генов клеточных шаперонов их индукцию осуществляли внесением в культуральную среду L-арабинозы (0,5%) либо тетрациклина (5 нг/мл) и предварительной инкубации до внесения индукторов экспрессии целевого гена. Далее бактериальные клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 6000 г и 4 °С.

Для оценки степени растворимости полученного белка осажденные клетки переводили в буфер А для разрушения (50 мМ Трис-НСI pH 7,5; 0,3 М NaCl; 0,005 М имидазола) и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе (Qsonica Q700) до просветления клеточной суспензии на льду (импульсы УЗ в течение 10 с, охлаждение — 60 с). Осаждали разрушенные клетки при помощи центрифугирования (15 000 г) в течение 30 мин при 4 °С. Далее отбирали пробы супернатанта, содержащего растворимую форму целевого белка, а осадок, содержащий агрегированную форму, растворяли в мочевины (2 М) для дальнейшего электрофоретического анализа. Разделение белков проводили при помощи электрофореза в ПААГ (10%) в денатурирующих условиях по стандартным методикам. После окраски красителем Кумасси голубым и отмывания от красителя гели фотографировали и проводили количественную оценку распределения белков между растворимой и нерастворимой формой. Денситометрический анализ гелей осуществляли с помощью приложения Image Lab (Bio-Rad; США).

#### Очистка белков с использованием аффинной хроматографии

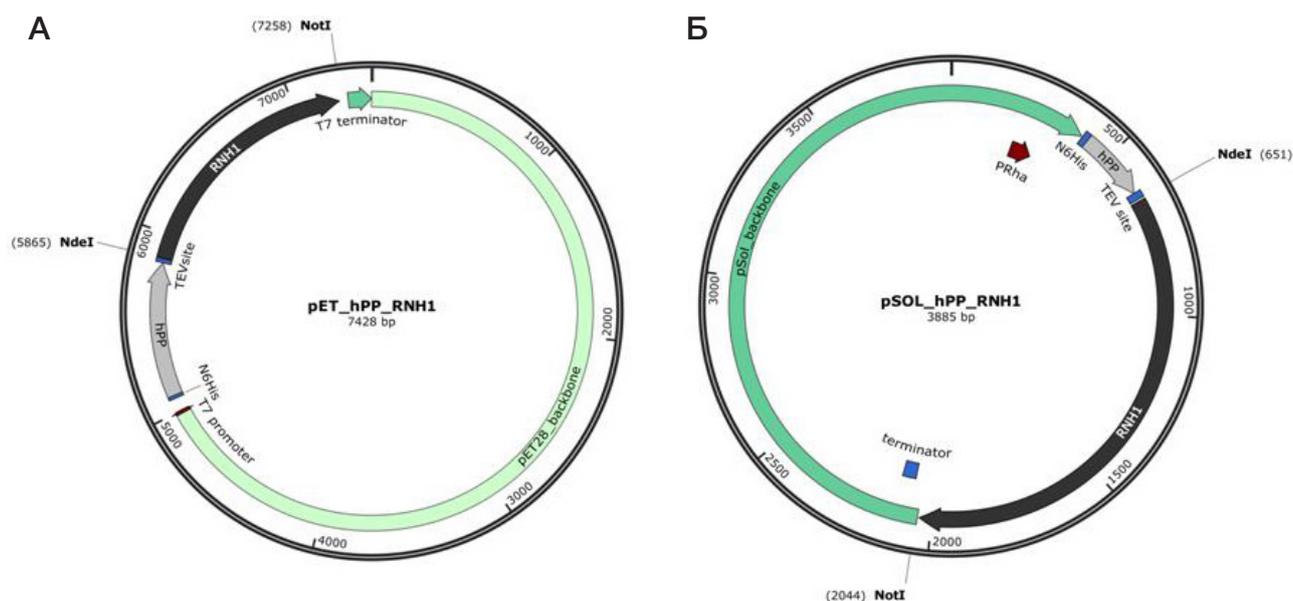
Надосадочную жидкость после ультразвукового разрушения биомассы и центрифугирования клеточного дебриса фильтровали через мембрану с размером пор 0,22 мкм. Таким образом получали препарат для хроматографической очистки, содержащий растворимую фракцию белков в буфере А (50 мМ Трис-НСI pH 7,5; 0,3 М NaCl; 0,005 М имидазола) для нанесения на хроматографический сорбент IMAC (Bio-Rad® Nuviatm IMAC Resin). Белок элюировали хроматографическим буфером В (50 мМ Трис-НСI pH 7,5; 0,5 М имидазола). Препарат, полученный после очистки с использованием IMAC, был сконцентрирован с помощью центрифужного концентратора Spin-X (размером пор 10 кДа) с 5 до 1 мл. При необходимости, далее препарат

очищенного белка обрабатывали TEV-протеазой согласно рекомендациям производителя, в течение ночи при 4 °С, а затем проводили повторную хроматографическую очистку, но собирали уже фракцию, не связавшуюся с сорбентом и содержащую очищенный ингибитор рибонуклеаз. Целевую фракцию диализовали против буфера хранения (40 мМ HEPES-КОН pH 7,6, 100 мМ KCl) при 4 °С. Для длительного хранения при –20 °С добавляли глицерин (50%) и DTT (8 мМ).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе работы по подбору оптимальных условий для наработки растворимой формы рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз мы решили расширить скрининг вспомогательных полипептидов, повышающих растворимость этого белка, поскольку такой подход уже был опробован ранее [4]. Для этого мы сконструировали набор из двадцати векторов на основе двух экспрессионных плазмид pET28a (Novagen; США) и pSol (Lucigen; США). Два вектора содержали кодон-оптимизированный для экспрессии в *E. coli* ген человеческого ингибитора рибонуклеаз (*RNH1*) с последовательностью, кодирующей полигистидиновую метку на N-конце белка, что в результате кодировало целевую белковую молекулу с гистидиновым хвостом для аффинной очистки. Остальные плазмиды кодировали химерные белки, состоящие из вспомогательных полипептидов (MBP, TIG, TSF, FH8, PpiB, YrhB, SUMO, TRX, GST) и рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз. Индукция экспрессии с T7-промотора (в случае pET28a) либо с рамнозного промотора (в случае pSol) в этих плаزمиде дает в итоге наработку химерных белков, состоящих из комбинаций ингибитора рибонуклеаз с разными вспомогательными полипептидами, содержащими полигистидиновую метку на N-конце для аффинной очистки (рис. 1). Необходимо отметить, что между геном ингибитора рибонуклеаз и генами вспомогательных полипептидов была внесена последовательность, кодирующая сайт протеолиза для TEV-протеазы. Таким образом, после первичной аффинной очистки есть возможность отщепления вспомогательного полипептида и проведения второй стадии аффинной хроматографии для получения чистого препарата ингибитора рибонуклеаз.

Все полученные генетические конструкции были опробованы в работе при типовых условиях наработки рекомбинантных белков в *E. coli*, для этого ими были трансформированы клетки штамма BL21 (DE3), и наработка белков была проверена при 37 °С. Инкубация бактериальных культур при 37 °С, как ожидалось, не дала наработки растворимой формы ингибитора рибонуклеаз — нерастворимые агрегаты формировались независимо от партнерского вспомогательного пептида и промотора, с которого запускалась экспрессия целевого гена (данные не представлены). При снижении температуры инкубации бактериальной культуры до 16 °С варианты без вспомогательных пептидов также образовывали тельца включения, однако несколько химерных белков нарабатывались в растворимой форме (рис. 2). Именно по этой причине все дальнейшие наработки рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз в этой работе мы проводили при пониженной температуре (16 °С). В частности, хороший результат был достигнут с такими вспомогательными полипептидами, как MBP (70–75% целевого продукта в растворимой форме), TIG (порядка 90% целевого продукта в растворимой форме) и, в меньшей степени, с PpiB (около 60% целевого продукта в растворимой форме).



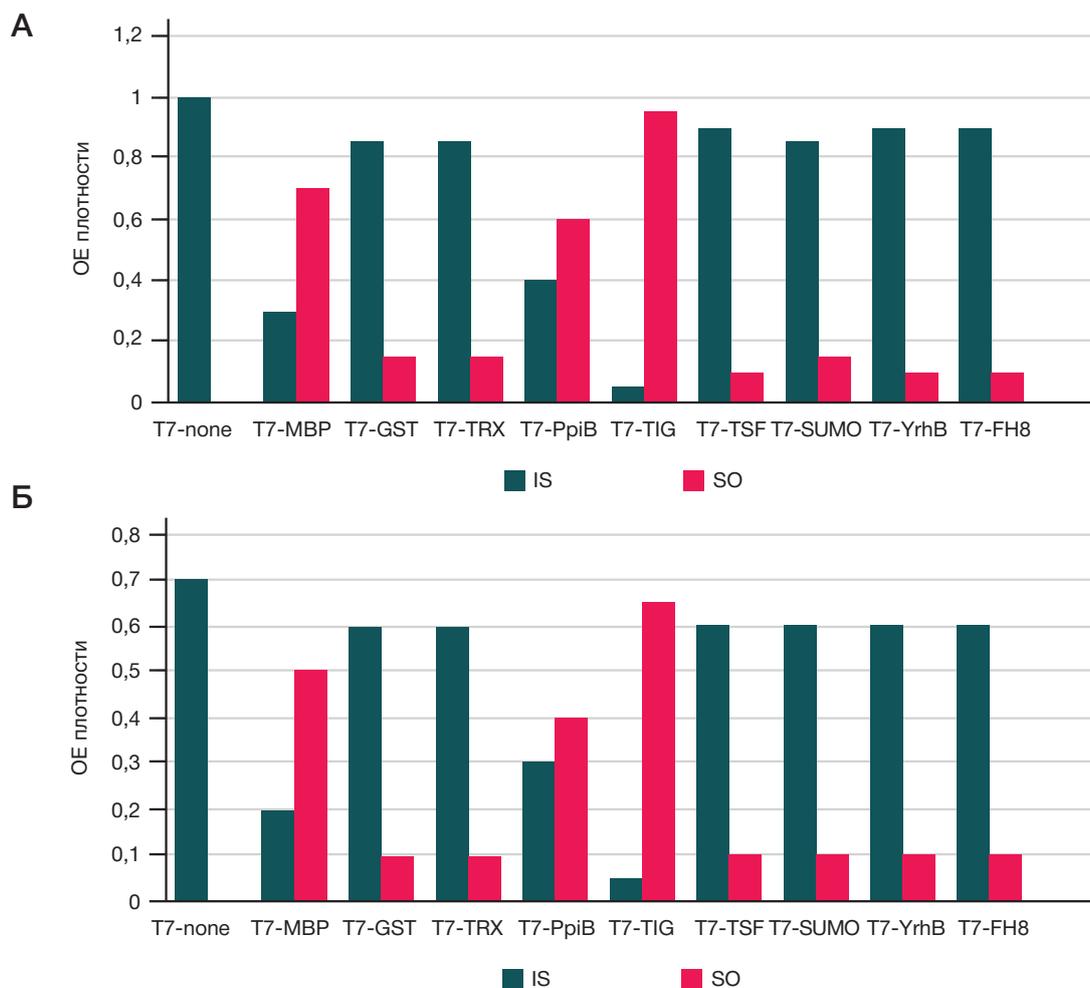
**Рис. 1.** Схематические карты векторов для наработки ингибитора рибонуклеаз с вспомогательными полипептидами, повышающими растворимость рекомбинантных белков в *E. coli*, для вариантов на основе вектора рЕТ28а с промотором Т7 (**А**), для вариантов на основе вектора рSOL с промотором PRha (**Б**). RNH1 — ген, кодирующий человеческий ингибитор рибонуклеазы; hPP — ген, кодирующий один из хелперных полипептидов (MBP, TIG, TSF, FH8, PpiB, YrhB, SUMO, TRX, GST). Остов вектора рЕТ28а (pET28\_backbone) содержит в себе ген устойчивости к канамицину, ориджин репликации рBR322, а также последовательность, кодирующую репрессор lacI. Остов вектора рSOL (pSOL\_backbone) содержит в себе ген устойчивости к канамицину, ориджин репликации рUC, промотор PRha, индуцируемый рамнозой и терминатор транскрипции

Векторы на основе рЕТ28а дали существенно большую продукцию белка за счет использования сильного промотора Т7, по сравнению с векторной системой рSOL, где используют не такой сильный рамнозный промотор (рис. 2). Тем не менее, часть целевого белка все равно переходила в функционально-неактивное состояние в тельцах включения, что можно было бы скорректировать дальнейшей оптимизацией условий наработки.

Далее мы решили сравнить уровень выхода растворимой формы ингибитора рибонуклеаз в разных штаммах *E. coli*, специально сконструированных для наработки рекомбинантных белков. Предыдущие экспериментальные подходы получения растворимой формы ингибитора рибонуклеаз в *E. coli*, как правило, разрабатывали с учетом опыта получения рекомбинантных продуцентов на основе штамма BL21 (DE3), однако в большинстве случаев этот штамм не является оптимальным для наработки белков, склонных к агрегации и дает существенную долю нерастворимых агрегатов. Поэтому для дальнейшего подбора оптимальных условий получения ингибитора рибонуклеаз мы попробовали сравнить уровень наработки белка еще в четырех штаммах, предназначенных для наработки рекомбинантных белков в *E. coli*. Для этого в дополнение к штамму BL21 (DE3) были выбраны следующие коммерчески доступные штаммы, с различными конструктивными особенностями, обусловленными их предназначением при наработке рекомбинантных белков. Штамм Origami 2 (DE3) имеет мутации в генах тиоредоксинредуктазы (trxB) и глутатионредуктазы (gor), которые способствуют формированию дисульфидных связей и корректному сворачиванию некоторых рекомбинантных белков в цитоплазме бактериальных клеток. Бактерии штамма BL21 Star (DE3) содержат мутацию в гене, кодирующем рибонуклеазу E (*rne131*), что увеличивает стабильность мРНК целевого гена и может повышать уровень наработки рекомбинантных белков. Было интересно еще попробовать в качестве продуцента штамм Rosetta (DE3) pLysS, который кроме возможности наработки белков без оптимизации

кодировочного состава их генов под *E. coli* позволяет также снизить фоновый уровень экспрессии с Т7-промотора за счет дополнительной экспрессии гена Т7 лизоцима — природного ингибитора ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага Т7, что особенно важно при наработке потенциально токсичных для бактерий белков. Наконец, штамм *E. coli* KRX имеет хромосомную копию гена Т7 ДНК-зависимой РНК-полимеразы под контролем рамнозного промотора, который существенно лучше контролирует базальную экспрессию, а также хорошо титруется рамнозой, в то же время давая высокую продукцию рекомбинантных белков, которая обеспечивается Т7-промотором [13].

Для проверки влияния штамма на продукцию растворимой формы ингибитора мы отобрали наиболее удачные варианты с предыдущего этапа работы, т. е. векторы на основе рЕТ28а, кодирующие химерные белки, в состав которых входят вспомогательные полипептиды MBP и TIG. Как отмечалось ранее, все сравнительные наработки в этих штаммах проводили при температуре инкубации бактериальной культуры 16 °С. По результатам всех наработок наилучший результат был получен в штамме KRX (рис. 3). Возможно, это связано с более подходящим режимом экспрессии гена Т7 ДНК-зависимой РНК-полимеразы под контролем рамнозного промотора, что дает лучшее дозирование накопления Т7 ДНК-зависимой РНК-полимеразы в клетках, а соответственно экспрессия гена рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз так же не «перегружена», как в случае прямой индукции промотора Т7 при помощи ИПТГ с lacUV5-промотора, где возможность снижения экспрессии при помощи титрования индуктора практически отсутствует. Штаммы BL21 (DE3) и BL21 Star (DE3) тоже достаточно хорошо подходят для наработок в комбинации с отобранными вспомогательными полипептидами и культивации на пониженных температурах, но дают более низкий выход итогового продукта в растворимой форме, чем KRX (примерно на 10–15% в зависимости от вспомогательного полипептида). Остальные два штамма давали существенно более низкий уровень белка, причем Origami 2 (DE3)



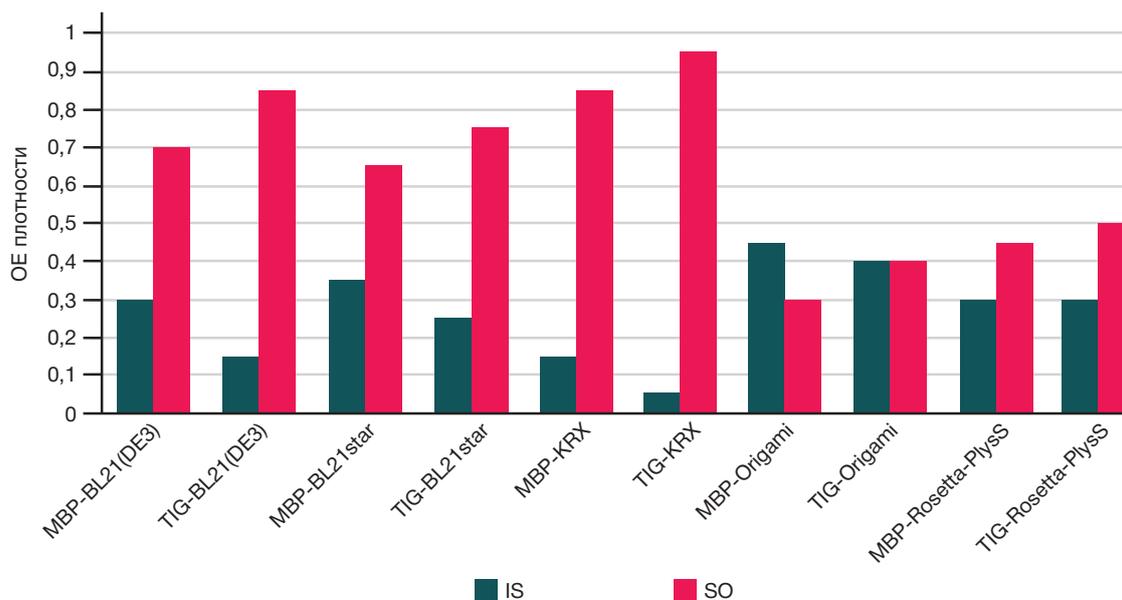
**Рис. 2.** Влияние вспомогательных полипептидов на растворимость ингибитора рибонуклеаз для вариантов на основе вектора pET28a с промотором T7 (A), для вариантов на основе вектора pSol с промотором PRha (B) при наработке в штамме *E. coli* BL21 (DE3) на 16 °С. Относительный уровень нерастворимой фракции (IS) обозначен красным цветом. Синим показан уровень наработки ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме (SO). OE плотности — относительные единицы измерения при денситометрии результатов ПААГ

давал худшие результаты, что скорее всего связано со специфичными мутациями в этом штамме, призванными создавать внутриклеточные условия для образования дисульфидных мостиков. Также низкие результаты можно связать с меньшим количеством биомассы, которую дают эти штаммы относительно штаммов KRX, BL21 (DE3) и BL21 Star (DE3) за одно и то же время роста бактериальной культуры, по-видимому, за счет внесенных мутаций, влияющих на жизнеспособность и метаболические процессы в клетках. Таким образом, после второго этапа работы, наилучшими комбинациями «штамм — вспомогательный полипептид» для получения растворимой формы ингибитора рибонуклеаз оказались *E. coli* KRX-MBP, *E. coli* KRX-TIG.

Наконец, еще одним инструментом для борьбы с образованием нерастворимых агрегатов при наработке рекомбинантных белков в *E. coli* является дополнительная ко-экспрессия генов клеточных шаперонов, которые помогают белкам принимать нативную конформацию. Для того чтобы проверить влияние шаперонов на корректный фолдинг ингибитора рибонуклеаз при наработке в *E. coli*, мы попробовали совместную экспрессию с генами таких шаперонов, как dnaK, dnaJ, grpE, groES и groEL. Ранее было продемонстрировано, что некоторые шапероны положительно влияют на наработку функционального ингибитора рибонуклеаз [14, 15]. Мы решили проверить влияние этих шаперонов на наилучшие комбинации

вспомогательных полипептидов (MBP, TIG, PpiB) и штамма *E. coli* KRX для наработки ингибитора рибонуклеаз. Интересно, что в наших условиях максимальный эффект (около 10% прибавки целевого продукта) влияния дополнительной коэкспрессии генов шаперонов на наработку целевого белка был от генов dnaK, dnaJ, grpE (рис. 4). В то же время было отмечено положительное влияние шаперона GroELS на выход растворимой формы ингибитора рибонуклеаз [12]. Возможные различия скорее всего обусловлены использованием разных штаммов.

Таким образом, лучшей комбинацией для получения высокого выхода растворимой формы ингибитора рибонуклеаз, которую мы выбрали в ходе этой работы, является культивация рекомбинантного штамма *E. coli* KRX при низкой температуре (16 °С), использование вспомогательных полипептидов TIG и MBP при наработке ингибитора рибонуклеаз, а также дополнительная коэкспрессия генов шаперонов dnaK, dnaJ, grpE. Для оценки точного количества выхода целевого белка была проведена хроматографическая очистка для выбранных комбинаций при помощи аффинной хроматографии на металл-хелатном носителе и последующей реакцией протеолиза с TEV-протеазой. Итоговое количество растворимой формы ингибитора рибонуклеаз составило: а) для комбинации *E. coli* KRX-TIG-dnaK, dnaJ, grpE — 60 мг/л; б) для комбинации *E. coli* KRX-MBP-dnaK, dnaJ, grpE — 45 мг/л.



**Рис. 3.** Выбор оптимального штамма *E. coli* для наработки рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме, с использованием векторов, кодирующих химерный белок, состоящий из комбинаций ингибитора рибонуклеаз с двумя вспомогательными полипептидами (MBP, TIG). Относительный уровень нерастворимой фракции (IS) обозначен красным цветом. Синим показан уровень наработки ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме (SO). OE плотности — относительные единицы измерения при денситометрии результатов ПААГ

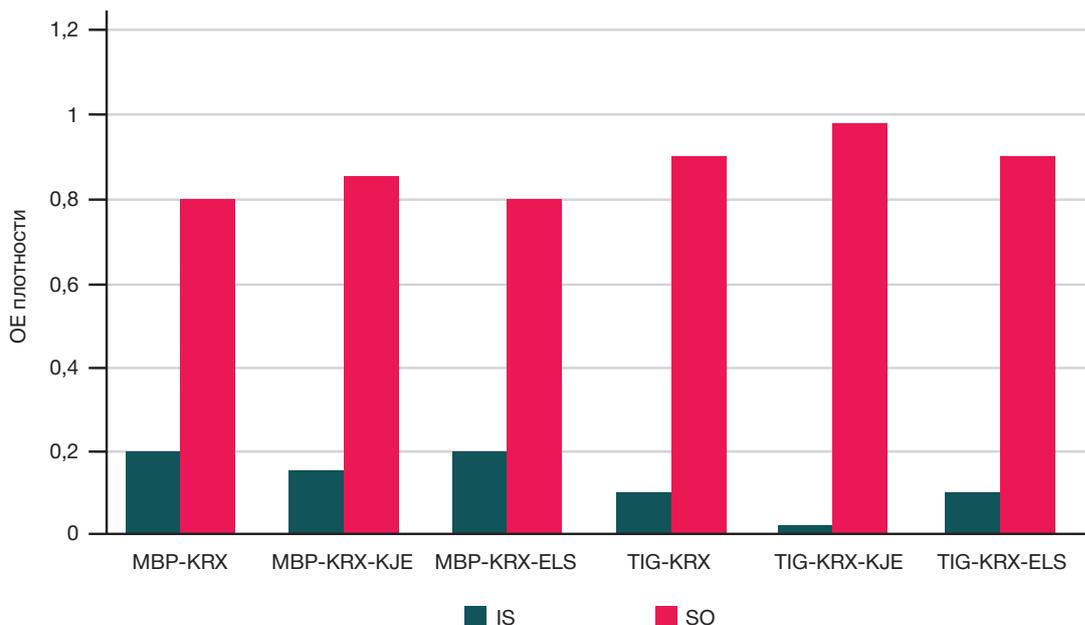
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Быстрое развитие области терапевтического применения синтетических мРНК диктует потребность в получении препаративных количеств белков для ферментативного получения большого количества РНК *in vitro* [16, 17]. Помимо ферментов, осуществляющих синтез и модификацию РНК *in vitro*, одним из важных компонентов реакционной смеси является ингибитор рибонуклеаз — белок, который предотвращает деградацию молекул РНК, вызванную рибонуклеазами, что особенно критично при получения терапевтических препаратов. Также ингибитор рибонуклеаз широко используют в исследовательской деятельности, в частности в задачах, связанных с синтезом РНК, кДНК, а также трансляцией *in vitro*. Получение этого белка в рекомбинантных штаммах *E. coli* осложняет специфика его структуры, богатой цистеиновыми остатками, а также склонность к агрегации в бактериальных клетках. Ранее были сделаны попытки получения растворимой формы ингибитора рибонуклеаз в *E. coli*, однако предложенные специфические условия наработки существенно усложняют технологический процесс и делают его затратным при масштабировании [11, 12]. В данной работе была поставлена цель найти комбинацию условий и способ для наработки ингибитора рибонуклеаз, подходящие для крупномасштабного получения этого белка, а также экономически выгодные с технологической точки зрения.

В качестве первого этапа работ по оптимизации мы провели скрининг ряда вспомогательных пептидов, которые могли бы повысить долю растворимого ингибитора рибонуклеаз при наработке в *E. coli*. Ранее было показано, что такие полипептиды могут значительно увеличить выход рекомбинантных белков в растворимой форме, в том числе ингибитора рибонуклеаз [4, 18]. Было доказано, что они могут оказывать влияние на увеличение растворимости различных рекомбинантных белков, формируя химерные молекулы, вспомогательную часть которой (хелперный полипептид) можно позже удалить протеолизом [9, 19]. Мы протестировали девять разных вспомогательных полипептидов MBP, TIG, TSF, FH8, PpiB, YrhB, SUMO,

TRX, GST, которые существенно различаются по своим физико-химическим свойствам. Дополнительно к этому мы протестировали эти вспомогательные полипептиды в двух экспрессионных системах — на основе коммерческой плазмиды рЕТ28а, где экспрессия целевого гена находится под контролем сильного промотора Т7, а также на основе вектора рSOL, где экспрессию контролирует рамнозный промотор. Из всех кандидатов наилучшие результаты для наработки ингибитора рибонуклеаз показали такие полипептиды, как MBP, TIG и PpiB. При этом MBP и TIG дали максимальное количество продукта, существенно превышая вариант со вспомогательным полипептидом PpiB (рис. 2). В целом, во всех экспериментах этой работы было замечено, что более крупные полипептиды, такие как MBP (42 кДа) и TIG (49 кДа), дают больше итогового целевого продукта, чем меньшие по молекулярной массе партнеры вроде PpiB (19 кДа). При сравнении количественного выхода целевых продуктов в двух линейках векторов — на основе рЕТ28а и рSol, в случае наработок ингибитора рибонуклеаз можно сделать однозначный выбор в пользу системы, где экспрессия целевого гена находится под контролем сильного промотора Т7 (рис. 2).

С наиболее продуктивными вариантами векторов на основе плазмиды рЕТ28а, кодирующими химерные варианты ингибитора рибонуклеаз со вспомогательными полипептидами MBP и TIG, мы перешли к следующему этапу оптимизации условий наработки — подбору подходящего штамма *E. coli* из некоторых коммерчески доступных вариантов. Для этого этапа был проведен сравнительный анализ продукции ингибитора рибонуклеаз в пяти разных штаммах *E. coli*, специально сконструированных для наработки рекомбинантных белков: BL21 (DE3), Origami 2 (DE3), BL21 Star (DE3), Rosetta (DE3) pLysS и KRX. Выбранные штаммы имеют разную специфику применения при получении целевых рекомбинантных белков в бактериях *E. coli*, что дает возможность сравнить их и выбрать наиболее подходящий для максимальной продукции ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме [20]. В наших условиях, наиболее высокие результаты при наработке ингибитора рибонуклеаз показал штамм *E. coli* KRX (рис. 3), и это



**Рис. 4.** Влияние дополнительной коэкспрессии генов клеточных шаперонов *dnaK*, *dnaJ*, *grpE* (на рисунке обозначены как KJE), *groES* и *groEL* (обозначены как ELS) на наработку рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз в штамме *E. coli* KRX при 16 °C. Относительный уровень нерастворимой фракции (IS) обозначен красным цветом. Синим показан уровень наработки ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме (SO). OE плотности — относительные единицы измерения при денситометрии результатов ПГАГ

может быть связано с тем, что ген T7 ДНК-зависимой РНК-полимеразы в этом штамме стоит под контролем рамнозного промотора, который имеет низкий базальный уровень активности, а также лучше титруется индуктором L-рамнозой. По-видимому, подобная конструктивная особенность позволяет найти оптимальный баланс между подходящими условиями бактериальных наработок токсичных или склонных к агрегации рекомбинантных белков, в то же время достигнуть высокого выхода целевого белка, снижая количество потерь белка в тельцах включения, что часто можно наблюдать при использовании штаммов, где хромосомная копия гена T7 ДНК-зависимой РНК-полимеразы стоит под контролем *lacUV5* промотора и индуцируется ИПТГ [21].

Наконец, для наиболее удачных комбинаций «штамм — вспомогательный полипептид» (*E. coli* KRX-MBP и *E. coli* KRX-TIG) мы решили проверить влияние на итоговый выход белкового продукта от дополнительной коэкспрессии генов клеточных шаперонов. Для этих целей мы использовали коммерческий набор (Takara; США), который включает векторы, несущие гены таких шаперонов, как *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groES* и *groEL*. Этот набор включает в себя гены основных клеточных шаперонов, дополнительная продукция которых в клетках *E. coli* часто помогает «проблемным» рекомбинантным белкам принять корректную конформацию, снижая образование нерастворимых агрегатов [14, 15]. В случае рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз уже было показано положительное влияние *groES* и *groEL* на наработку белка в анаэробных условиях [12], что не всегда удобно при масштабировании технологических процессов получения рекомбинантных белков. Интересно, что в наших экспериментальных условиях при аэробном культивировании *E. coli* на пониженной температуре (16 °C) наилучшие результаты по наработке ингибитора рибонуклеаз были достигнуты для двух комбинаций компонентов: а) вспомогательный полипептид MBP, дополнительная коэкспрессия генов шаперонов *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, штамм *E. coli* KRX; б) вспомогательный

полипептид TIG, дополнительная коэкспрессия генов шаперонов *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, штамм *E. coli* KRX (рис. 4). Для точной количественной оценки наработки рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз в таких комбинациях была проведена стадия аффинной очистки, после которой сравнивали выход целевого продукта для обоих вариантов (MBP и TIG). Первая комбинация дает выход белкового продукта на уровне 45 мг/л. Однако максимальный выход конечного продукта, т. е. растворимой формы ингибитора рибонуклеаз, был достигнут при аэробном культивировании штамма *E. coli* KRX на пониженной температуре (16 °C), трансформированного экспрессионным вектором на основе pET28a с кодон-оптимизированным геном ингибитора рибонуклеаз, в комбинации с геном вспомогательного полипептида TIG на фоне дополнительной коэкспрессии генов шаперонов *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*. Такой вариант дает выход 60 мг/л при культивировании бактерий в колбах на стандартной среде LB. Что существенно выше, чем результаты, достигнутые ранее, а также проще с точки зрения технологий культивирования продуцента [4, 11, 12, 22].

Полученные данные еще раз подтверждают необходимость комплексного подхода при поиске оптимальных условий для наработки рекомбинантных белков, склонных к агрегации, в бактериальных продуцентах *E. coli*, особенно если это касается условий для масштабирования технологических процессов при получении ферментов, терапевтических белков, таких как препараты цитокинов или антигенов для вакцин [23].

## ВЫВОДЫ

Результаты этой работы демонстрируют, что при системном подборе комбинации условий и компонентов при наработках ферментов и терапевтических рекомбинантных белков в *E. coli*, которые склонны к агрегации и формируют тельца включения при обычных условиях культивации бактерий, можно добиться существенно большего выхода целевого белка в растворимой форме. При этом можно найти баланс условий и компонентов, приемлемый для

полупромышленных и промышленных масштабов получения рекомбинантного белка, минимизировать потери белка в виде накопления нерастворимых агрегатов. Необходимо отметить, что итоговый протокол наработки ингибитора рибонуклеаз, который был подобран в ходе этого исследования, все еще можно оптимизировать, учитывая опыт более ранних работ и возможный подбор

питательных сред, отличных от стандартной LB, и переход на культивирование в ферментере, что еще больше увеличит итоговый выход продукта. Однако даже в таком виде схема наработки применима для масштабирования при полупромышленных наработках этого белка в препаративных количествах для дальнейшего применения в ферментативном синтезе РНК *in vitro*.

## Литература

1. Moenner M, Vosoghi M, Ryazantsev S, Glitz DG. Ribonuclease inhibitor protein of human erythrocytes: characterization, loss of activity in response to oxidative stress, and association with Heinz bodies. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 1998; 24 (2): 149–64. DOI: 10.1006/bcmd.1998.0182.
2. Klink TA, Vicentini AM, Hofsteenge J, Raines RT High-level soluble production and characterization of porcine ribonuclease inhibitor. *Protein expression and purification*. 2001; 22 (2): 174–79. DOI: 10.1006/prep.2001.1422.
3. Kobe B, Deisenhofer J. Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. *Journal of molecular biology*. 1996; 264 (5): 1028–43. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0694.
4. Guo W, Cao L, Jia Z, Wu G, Li T, Lu F, et al. High level soluble production of functional ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by fusing it to soluble partners. *Protein expression and purification*. 2011; 77 (2): 185–92. DOI: 10.1016/j.pep.2011.01.015.
5. Dickson KA, Haigis MC, Raines RT. Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 2005; 80: 349–74. DOI: 10.1016/S0079-6603(05)80009-1.
6. Fominaya JM, Hofsteenge J. Inactivation of ribonuclease inhibitor by thiol-disulfide exchange. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267 (34): 24655–60.
7. Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current opinion in structural biology*. 2001; 11 (6): 725–32. DOI: 10.1016/S0959-440x(01)00266-4.
8. Blackburn P. Ribonuclease inhibitor from human placenta: rapid purification and assay. *Journal of Biological Chemistry*. 1979; 254 (24): 12484–7.
9. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*. 2014; 5: 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.
10. Lee FS, Vallee BL. Expression of human placental ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989; 160 (1): 115–20. DOI: 10.1016/0006-291x(89)91628-8.
11. Šiurkus J, Neubauer P. Reducing conditions are the key for efficient production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 2011; 10 (1): 1–15. DOI: 10.1186/1475-2859-10-31.
12. Šiurkus J, Neubauer P. Heterologous production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by redox state control and chaperonin coexpression. *Microbial cell factories*. 2011; 10: 1–11. DOI: 10.1186/1475-2859-10-65.
13. Ohana RF, Encell LP, Zhao K, Simpson D, Slater MR, Urh M, et al. HaloTag7: A genetically engineered tag that enhances bacterial expression of soluble proteins and improves protein purification. *Protein Expression and Purification*. 2009; 68 (1): 110–20. DOI: 10.1016/j.pep.2009.05.010.
14. Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura, T. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, CryJ2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol*. 1998; 64: 1694–99. DOI: 10.1128/AEM.64.5.1694-1699.
15. Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol*. 2000; 66: 884–89. DOI: 10.1128/AEM.66.3.884-889.2000.
16. Захарова М. В., Нагорных М. О. Получение бактериального продуцента ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага Т7 для синтеза РНК *in vitro*. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2022; 12: 9–14. DOI: 10.17513/mjpf.13476.
17. Fuchs AL, Neu A, Sprangers R. A general method for rapid and cost-efficient large-scale production of 5' capped RNA. *RNA*. 2016; 22 (9): 1454–66. DOI: 10.1261/rna.056614.116.
18. Ortega C, Oppezzo P, Correa A. Overcoming the Solubility Problem in *E. coli*: Available Approaches for Recombinant Protein Production. *Methods Mol Biol*. 2022; 2406: 35–64. DOI: 10.1007/978-1-0716-1859-2\_2.
19. Jia B, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open biology*. 2016; 6 (8): 160196. DOI: 10.1098/rsob.160196.
20. Morão LG, Manzi LR, Clementino LOD, Wrenger C, Nascimento AS. A scalable screening of *E. coli* strains for recombinant protein expression. *PLOS ONE* 2022; 17 (7): e0271403. DOI: 10.1371/journal.pone.0271403.
21. Zhang ZX, Nong FT, Wang YZ, Yan CX, Gu Y, Song P, et al. Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. *Microb Cell Fact*. 2022; 21 (191). DOI: 10.1186/s12934-022-01917-y.
22. Flachner B, Dobi K, Benedek A, Cseh S, Lőrincz Z, Hajdú I. Robust Recombinant Expression of Human Placental Ribonuclease Inhibitor in Insect Cells. *Biomolecules*. 2022; 12 (2): 273. DOI: 10.3390/biom12020273.
23. Mital S, Christie G, Dikicioglu D. Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: a systematic review of experimental design and its manufacturing implications. *Microb Cell Fact*. 2021; 20 (1): 208. DOI: 10.1186/s12934-021-01698-w.

## References

1. Moenner M, Vosoghi M, Ryazantsev S, Glitz DG. Ribonuclease inhibitor protein of human erythrocytes: characterization, loss of activity in response to oxidative stress, and association with Heinz bodies. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 1998; 24 (2): 149–64. DOI: 10.1006/bcmd.1998.0182.
2. Klink TA, Vicentini AM, Hofsteenge J, Raines RT High-level soluble production and characterization of porcine ribonuclease inhibitor. *Protein expression and purification*. 2001; 22 (2): 174–79. DOI: 10.1006/prep.2001.1422.
3. Kobe B, Deisenhofer J. Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. *Journal of molecular biology*. 1996; 264 (5): 1028–43. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0694.
4. Guo W, Cao L, Jia Z, Wu G, Li T, Lu F, et al. High level soluble production of functional ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by fusing it to soluble partners. *Protein expression and purification*. 2011; 77 (2): 185–92. DOI: 10.1016/j.pep.2011.01.015.

- 2011; 77 (2): 185–92. DOI: 10.1016/j.pep.2011.01.015.
5. Dickson KA, Haigis MC, Raines RT. Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 2005; 80: 349–74. DOI: 10.1016/S0079-6603(05)80009-1.
  6. Fominaya JM, Hofsteenge J. Inactivation of ribonuclease inhibitor by thiol-disulfide exchange. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267 (34): 24655–60.
  7. Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current opinion in structural biology*. 2001; 11 (6): 725–32. DOI: 10.1016/S0959-440x(01)00266-4.
  8. Blackburn P. Ribonuclease inhibitor from human placenta: rapid purification and assay. *Journal of Biological Chemistry*. 1979; 254 (24): 12484–7.
  9. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*. 2014; 5: 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.
  10. Lee FS, Vallee BL. Expression of human placental ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989; 160 (1): 115–20. DOI: 10.1016/0006-291x(89)91628-8.
  11. Šiurkus J, Neubauer P. Reducing conditions are the key for efficient production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 2011; 10 (1): 1–15. DOI: 10.1186/1475-2859-10-31.
  12. Šiurkus J, Neubauer P. Heterologous production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by redox state control and chaperonin coexpression. *Microbial cell factories*. 2011; 10: 1–11. DOI: 10.1186/1475-2859-10-65.
  13. Ohana RF, Encell LP, Zhao K, Simpson D, Slater MR, Urh M, et al. HaloTag7: A genetically engineered tag that enhances bacterial expression of soluble proteins and improves protein purification. *Protein Expression and Purification*. 2009; 68 (1): 110–20. DOI: 10.1016/j.pep.2009.05.010.
  14. Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol*. 1998; 64: 1694–99. DOI: 10.1128/AEM.64.5.1694-1699.
  15. Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol*. 2000; 66: 884–89. DOI: 10.1128/AEM.66.3.884-889.2000.
  16. Zaharova MV, Nagornyh MO. Poluchenie bakterial'nogo producenta DNK-zavisimoy RNK-polimerazy bakteriofaga T7 dlja sinteza RNK in vitro. *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovaniy*. 2022; 12: 9–14. DOI: 10.17513/mjpf.13476. Russian.
  17. Fuchs AL, Neu A, Sprangers R. A general method for rapid and cost-efficient large-scale production of 5' capped RNA. *RNA*. 2016; 22 (9): 1454–66. DOI: 10.1261/ma.056614.116.
  18. Ortega C, Oppezzo P, Correa A. Overcoming the Solubility Problem in *E. coli*: Available Approaches for Recombinant Protein Production. *Methods Mol Biol*. 2022; 2406: 35–64. DOI: 10.1007/978-1-0716-1859-2\_2.
  19. Jia B, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open biology*. 2016; 6 (8): 160196. DOI: 10.1098/rsob.160196.
  20. Morão LG, Manzi LR, Clementino LOD, Wrenger C, Nascimento AS. A scalable screening of *E. coli* strains for recombinant protein expression. *PLOS ONE* 2022; 17 (7): e0271403. DOI: 10.1371/journal.pone.0271403.
  21. Zhang ZX, Nong FT, Wang YZ, Yan CX, Gu Y, Song P, et al. Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. *Microb Cell Fact*. 2022; 21 (191). DOI: 10.1186/s12934-022-01917-y.
  22. Flachner B, Dobi K, Benedek A, Cseh S, Lőrincz Z, Hajdú I. Robust Recombinant Expression of Human Placental Ribonuclease Inhibitor in Insect Cells. *Biomolecules*. 2022; 12 (2): 273. DOI: 10.3390/biom12020273.
  23. Mital S, Christie G, Dikicioglu D. Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: a systematic review of experimental design and its manufacturing implications. *Microb Cell Fact*. 2021; 20 (1): 208. DOI: 10.1186/s12934-021-01698-w.

## СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО СВЕТОИНДУЦИРУЕМОГО СЕНСОРА ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЯДРЫШКА

П. А. Журлова, З. В. Беседовская, Е. Л. Соколинская, Л. В. Путляева ✉

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

Ядрышки участвуют в усилении продукции рРНК и поддержании биогенеза рибосом в опухолевых клетках, что делает их желанной мишенью в генетических и онкологических исследованиях. Наиболее удобным методом визуализации ядрышка благодаря своей эффективности и доступности является флуоресцентная микроскопия. В настоящее время методы визуализации ядрышек либо неточны, либо непригодны для живых клеток, либо требуют постоянного окрашивания для живого мониторинга. Целью исследования было создать генетически кодируемую систему фотоиндуцируемых сенсоров (light-activated nucleolus sensor, LANS) для визуализации ядрышка в реальном времени. Комбинация домена eMags для фотоиндуцируемой димеризации и ридерного домена белка DPF3 позволяет системе LANS эффективно осуществлять направленное перемещение целевого белка в ядрышко посредством облучения клетки короткими импульсами синего света, не влияя на морфологию клеток. Данная система позволяет увеличить представленность пробы LANS2 в ядрышке в 1,5 раза относительно значений интенсивности флуоресценции, полученных до облучения ядрышка. Созданная система сенсоров LANS позволит ускорить поиск новых лекарств и улучшить первичный скрининг лекарственных соединений в моделях *in vivo*.

**Ключевые слова:** эпигенетика, флуоресцентные белки, eMags, оптогенетика, ядрышко

**Финансирование:** работа была поддержана грантом РФФИ № 22-24-01109.

✉ **Для корреспонденции:** Лидия Викторовна Путляева  
Большой бульвар, д. 30, стр. 1, г. Москва, Россия, 121205; lidia.mikhailova@mail.ru

**Статья получена:** 27.11.2023 **Статья принята к печати:** 11.12.2023 **Опубликована онлайн:** 17.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.048

## GENETICALLY ENCODED LIGHT-INDUCIBLE SENSOR FOR NUCLEOLAR VISUALIZATION

Zhurlova PA, Besedovskaia ZV, Sokolinskaya EL, Putlyaeva LV ✉

Skolkovo institute of science and technology, Center for Molecular and Cellular Biology, Moscow, Russia

Nucleolus plays a vital role in enhancing rRNA production and maintaining ribosome biogenesis in tumor cells, making the nucleolus a desirable target for genetic and oncological research. The most convenient method for nucleolus monitoring is fluorescent microscopy, combining high efficiency and accessibility. Nevertheless, currently available fluorescent visualization methods are unsuitable for live-cell monitoring of nucleolus because they require continuous labeling. To address this issue, we have developed a genetically encoded Light-Activated Nucleolus Sensing (LANS) system for real-time nucleolar visualization. The combination of eMags domains and reader domain of DPF3 protein, responsible respectively for the light-induced dimerization and targeting the nucleolus, allowed LANS system to efficiently target nucleolus in several cancer cell lines without affecting cell morphology. This system makes it possible to increase the representation of the LANS2 sample in the nucleolus by 1.5 times relative to the fluorescence intensity values obtained before irradiation of the nucleolus. LANS holds the potential to accelerate the search for new drugs and enhance the primary screening of drug compounds in *in vivo* models.

**Keywords:** epigenetics, fluorescent proteins, eMags, optogenetics, nucleolus

**Funding:** this work was supported by the Russian Science Foundation grant № 22-24-01109.

✉ **Correspondence should be addressed:** Lidia V. Putlyaeva  
Bolshoy Boulevard, 30, Moscow, Russia, 121205; lidia.mikhailova@mail.ru

**Received:** 27.11.2023 **Accepted:** 11.12.2023 **Published online:** 17.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.048

Ядрышко представляет собой внутриядерный компартмент, играющий ключевую роль в регуляции клеточного цикла, биогенезе рибосом, активности теломеразы, метаболизме р53 и процессинге малых РНК. Тем не менее, основная роль ядрышка — биогенез рибосом — один из наиболее энергоемких и жестко регулируемых процессов в клетке [1]. Подавление транскрипции рРНК гена связано с уменьшением размера ядрышек, и, как следствие, с уменьшением скорости синтеза белка и роста клеток [2], [3]. В опухолевых клетках морфология ядрышка меняется, а именно происходит увеличение размеров и аномально стимулированных функций, изменение молекулярных путей таких супрессоров опухоли, как pRb, p53, c-Мус, циклин D1, NF-κB, ErbB3, BCL-2, RAD51 и BCL-2 [4–8]. Для терапии гематологических раковых заболеваний разрабатываются различные терапевтические стратегии [9–11], в основе которых лежит таргетное воздействие на ядрышко, включая использование селективных ингибиторов РНК Pol I, mTOR, АКТ и т. д. [9] при немелкоклеточном раке

легкого [12], раке почки, раке молочной железы, лимфоме [13] и др. Таким образом, мониторинг и визуализация ядрышка могут быть важны при разработке новых химиотерапевтических агентов, а также при изучении их потенциальных побочных эффектов.

Наиболее распространенным способом визуализации ядрышка является иммуофлуоресцентное окрашивание антителами, специфичными к ядрышковым белкам [14]. Основным недостатком данного метода является невозможность его использования для изучения динамических процессов в клетках. Удобным способом прижизненной визуализации ядрышек может быть флуоресцентная микроскопия из-за ее относительной простоты и возможности применения пространственно-временного анализа флуоресцентных изображений [15]. Недавно был разработан флуоресцентный зонд для одновременной визуализации митохондрий и ядрышек, содержащий два эмиссионных металлокомплекса на основе пирозола, связанного трифенилфосфином,

связанным с медью (C1 и C2) [16]. Другая группа создала аналогичный двойной флуоресцентный зонд, нацеленный на митохондрии и ядрышки. Синтезированная молекула основана на 9-(дициановинил)юлолидиноме (DCVJ) роторе и проявляла минимальную цитотоксичность [17].

Таким образом, все вышеперечисленные методы подходят для живой визуализации клетки, что важно для мониторинга клеточного ответа на различные стимулы. Ключевым недостатком таких методов является невозможность наблюдения за клетками в течение длительного времени, так как флуоресцентный краситель со временем разрушается и не передается дочерним клеткам. Для решения этой проблемы можно использовать генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры, сочетающие в себе высокую гибкость, специфичность и подходящие для различных биологических систем. В большинстве случаев флуоресцентные биосенсоры малотоксичны и не мешают нормальным физиологическим процессам, что позволяет осуществлять мониторинг живых клеток в режиме реального времени. Еще одним преимуществом флуоресцентных анализов является то, что они требуют меньше времени, чем большинство анализов с фиксированными клетками [18]. Недавно была разработана оптогенетическая система для светоиндуцированного белок-белкового взаимодействия под названием enhanced Magnets (eMags) [19]. Данная система фотодимеризующихся белковых доменов создана на основе фоторецептора Vivid (VVD) из Нейроспоры густой (*Neurospora crassa*). Под воздействием синего света мономер VVD претерпевает конформационные изменения, что приводит к формированию димера, и следовательно, делает возможной обратимую светозависимую димеризацию изучаемых белков.

В данной работе описана новая генетически кодируемая система флуоресцентных сенсоров (light-activated nucleolus sensors, LANS) для визуализации ядрышка в реальном времени. LANS использует преимущества светозависимой димеризации системы eMags, что позволяет использовать данный сенсор для светоиндуцируемого рекрутирования целевых белков. Сенсоры LANS могут быть полезны для проведения биомедицинских исследований, а именно тестирования препаратов, оказывающих влияние на ядрышки.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Молекулярное клонирование

Все плазмиды были созданы с использованием системы клонирования Голден Гейт (Golden Gate cloning system) [20] и набора векторов для клонирования MoClo Toolkit (AddGene Kit #1000000044). Последовательности eMagA и eMagB были взяты из статьи [19] и синтезированы фирмой «Клонинг Фасилити» (Москва, Россия) в векторе pAGM1301. Последовательность DPF3 была амплифицирована с использованием праймеров DPF3\_CCAT\_FOR gttGAAGA CatCCATggaacagtcattcccaataactactgtgacttctgcttggggggctc caacatgaacaagaagagtgggcgcc и DPF3\_AATG\_REV gttGA AGACatCATTGTGGCGACCGGTCCGGATCCGCCCGCCG CTtttgagcagttccag, добавляющих в последовательность сайт рестрикции BpII, далее была клонирована в вектор pAGM1276. Для сборки итоговых плазмид eMagB-mScarlet и DPF3-mNeonGreen-eMagA использовалась технология MoClo и вектор pICH47732 согласно протоколу, описанному

в [20]. Для клонирования использовались рестриктазы BpII (BbsI) и Eco31I (BsaI) (Thermo Scientific, Waltham, MA; USA), и лигаза фага T4 (Евроген; Россия).

### Ведение и трансфекция клеточной культуры

Клетки линии HEK293T культивировали при 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) в среде DMEM («ПанЭко»; Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (BioSera; Франция), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина («ПанЭко»; Россия).

Для проведения трансфекции культуру клеток HEK293 растили в среде DMEM-full на 35 мм чашках Петри со стеклянным дном (SPL Life Sciences; Корея). Для трансфекции использовался реактив GenJect-39 («Молекта»; Россия) согласно инструкции производителя.

### Флуоресцентная микроскопия живых клеток

При проведении экспериментов по визуализации живых клеток клетки культивировали в конфокальных чашках со стеклянным дном (SPL Life Sciences; Корея). Непосредственно перед микроскопией среда DMEM заменялась на среду для визуализации MEM («ПанЭко»; Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (BioSera; Франция) и 20 мМ HEPES (Corning; NY, USA).

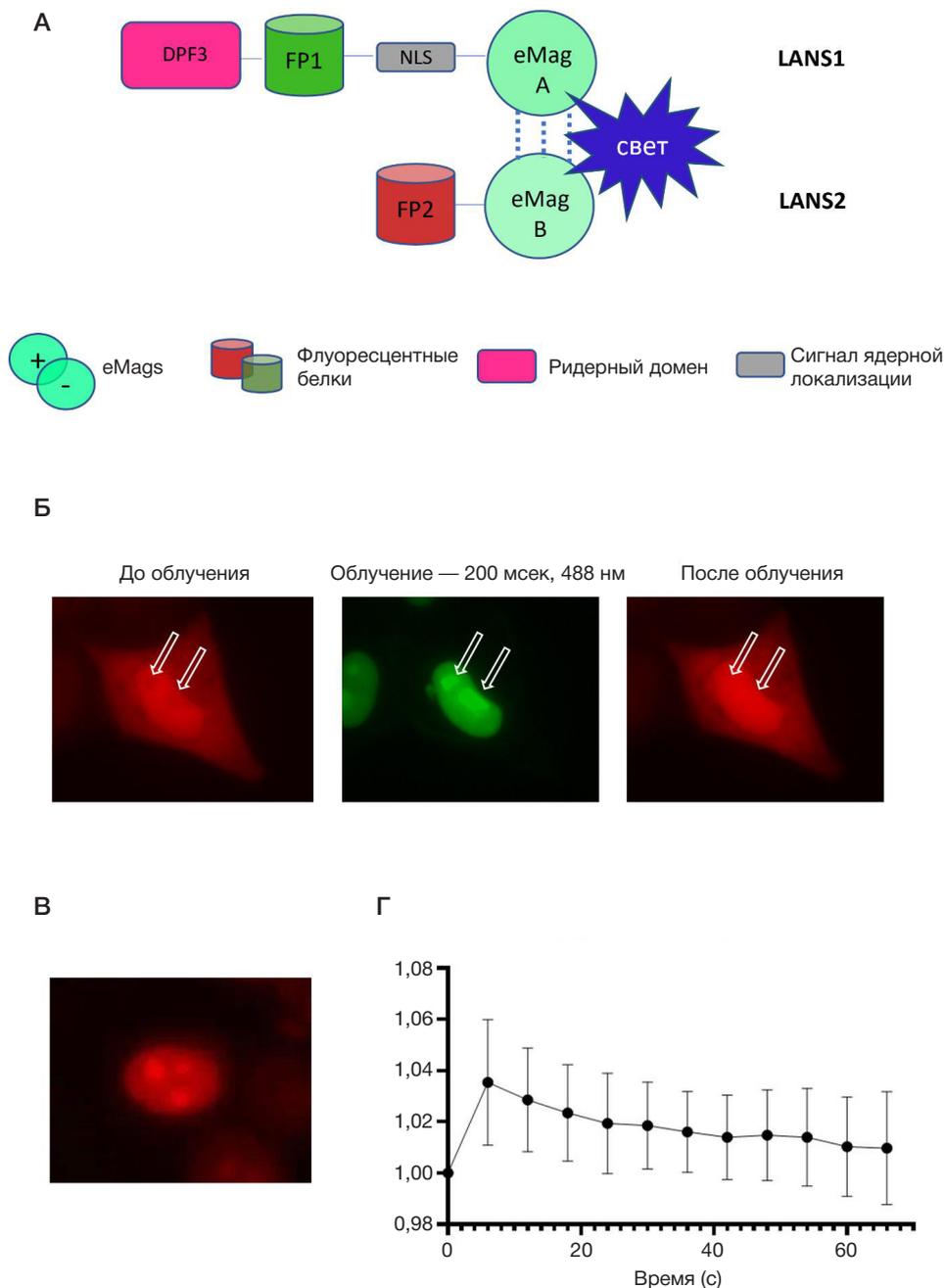
Для *in vivo* флуоресцентной микроскопии использовали флуоресцентный микроскоп Keyence Bioevo BZ-9000 (Keyence; Япония). Клетки снимали при увеличении 60x, используя объектив CFI Plan Apo λ60xH/NA1.40. Съемки вели в двух каналах: зеленом (фильтр-куб GFP-B, возбуждение 480/30 нм) для облучения клеток синим светом на протяжении 200 мс и красном (фильтр-куб Texas Red, возбуждение 560/40 нм, испускание 630/75 нм) для детекции флуоресценции eMagB-mScarlet.

### Анализ изображений

Для расчета отношения флуоресценции ядрышко/цитоплазма во времени использовался инструмент «ROI Manager» программного обеспечения Fiji. Первый ROI устанавливался вручную в область ядрышка, второй ROI устанавливался в область цитоплазмы в той же клетке. Значения, соответствующие соотношению ядрышко/цитоплазма (интенсивность флуоресценции, рис. 1), были получены путем деления ROI 1 на ROI 2, а затем деления полученного значения на значение, соответствующее изображению ядра до облучения. График построен с помощью GraphPad Prism 8.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для визуализации ядрышка мы создали систему генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров (LANS), представляющую собой пару фотодимеризующихся зондов LANS1 и LANS2. LANS1 включает в себя последовательность PHD-домена белка DPF3, слитую с зеленым флуоресцентным белком mNeonGreen, сигналом ядерной локализации (NLS) и последовательностью фотодомена eMagA (рис. 1A, верхняя панель). eMagA является частью светозависимой системы enhanced Magnets (eMags), созданной на основе фоторецептора Vivid (VVD) из Нейроспоры густой (*Neurospora crassa*) [19]. Парой к созданному сенсору LANS1 является плазида LANS2, экспрессирующая фотодомен eMagB, красный



**Рис. 1.** Характеристика генно-инженерной системы сенсоров, обеспечивающей светозависимое рекрутирование eMagB-mScarlet в область ядрышек. **А.** Схематичное изображение светозависимой димеризации проб, задействованных в эксперименте. *Белыми стрелками* отмечена область ядрышек. **Б.** Репрезентативные изображения флуоресцентной микроскопии клеток HeLa, трансфицированных сенсорами eMagB-mScarlet и DPF3-mNeonGreen-eMagA до облучения синим светом (*слева*), на протяжении облучения (*в середине*) и после облучения (*справа*). **В.** Флуоресцентное изображения ядра клетки HEK293T, экспрессирующей DPF3-mScarlet. **Г.** График, отображающий отношение относительной флуоресценции ядрышко/цитоплазма к относительной флуоресценции до индукции на протяжении эксперимента (размер выборки  $n = 33$ )

флуоресцентный белок mScarlet (рис. 1А, нижняя панель). В свою очередь, DPF3 представляет собой домен, афинный к модификации гистона H3K4me1 в его димерном состоянии, однако в нашей лаборатории было экспериментально показано, что продукт сенсора на основе DPF3 в мономерной форме может накапливаться в ядрышке (рис. 1В). Одновременное использование в эксперименте молекулярных конструкций с DPF3-mNeonGreen-eMagA и mScarlet-eMagB позволило осуществить обратимую светозависимую гетеродимеризацию целевых белков при кратковременном облучении синим светом (рис. 1Б).

Чтобы доказать обратимость связывания LANS с ядрышком, мы сначала облучали клетки, экспрессирующие LANS, на протяжении 200 мс, а затем

инкубировали клетки в темноте. Подсчет относительного изменения флуоресценции до и после облучения показал, что транслокация пробы из ядрышек в нуклеоплазму происходит примерно в течение 60 с (рис. 1Г).

Таким образом, мы показали, что созданная система сенсоров LANS может быть использована для обратимой светозависимой визуализации ядрышкового компартмента клетки. Комбинация LANS1, имеющего сродство к белкам ядрышек, и LANS2, находящегося в цитоплазме, позволила рекрутировать LANS2 в ядрышковые области посредством облучения клетки короткими импульсами синего света. Сенсор LANS может быть использован для изучения динамики ядрышка и направленного транспорта целевой ДНК в ядрышко.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ядрышко представляет собой динамичный субъядерный компартмент, организованный посредством разделения фаз, участвующий в синтезе рибосомной РНК, процессинге и сборке рибонуклеопротеинов для биогенеза рибосом. Также изменения в структуре ядрышка могут быть связаны со старением и играть роль в развитии различных патологий человека, включая рак и нейродегенерацию [21]. На разработку систем доставки целевых белков в ядрышко с использованием оптогенетических технологий направлены усилия многочисленных лабораторий во всем мире [22]. Подобные системы основаны на использовании фоточувствительных белков, которые под воздействием света с определенной длиной волны претерпевают конформационные изменения и димеризуются, тем самым сближая целевые белки. Фотодимеризующиеся домены успешно используются исследователями для манипуляции различными клеточными процессами, такими как сигнальные пути [23], [24], транспорт клеточных органелл [25, 26], ядерно-цитоплазматический транспорт [27, 28], динамика цитоскелета [29], фазовая сепарация [30, 31].

Полученные в данной работе результаты, свидетельствующие о возможности осуществлять светоиндуцированный таргетинг в ядро, вполне согласуются с данными, полученными в других лабораториях. Например, фотоиндуцируемый сигнал ядерной локализации LINUS позволил исследователям транслоцировать белок mCherry

из цитоплазмы в ядро, увеличив его представленность в ядре примерно в 1,8 раза [32], в то время как созданная нами система LANS позволила увеличить представленность пробы LANS2 в ядрышке в 1,5 раза относительно значений интенсивности флуоресценции, полученных до облучения ядрышка. Таким образом, данная система сенсоров может быть полезна для светоиндуцируемого рекрутирования целевых белков в ядрышко.

## ВЫВОДЫ

В данной работе описана принципиально новая генетически кодируемая светоиндуцируемая система сенсоров LANS с минимальным уровнем токсического воздействия на клетки, объединившая подходы по созданию генетически кодируемых сенсоров для картирования ядрышка с методом оптогенетики. Благодаря светозависимой гетеродимеризации фотодоменов eMagA и eMagB в составе системы сенсоров мы наблюдали перемещение пробы LANS2 из цитоплазмы и визуализацию ядрышкового компартмента клетки. Стоит отметить, что отношение интенсивности флуоресценции ядрышко/цитоплазма до и после облучения не очень высокое (рис. 1Г), что может быть объяснено слишком высоким уровнем экспрессии сенсоров LANS1 и LANS2 в данном эксперименте. Эта проблема может быть решена в дальнейшем путем подбора оптимальных концентраций сенсоров или созданием стабильной клеточной линии, экспрессирующей сенсоры.

## Литература

- Engbrecht M, Mangerich A. The Nucleolus and PARP1 in Cancer Biology. *Cancers*. 2020; 12.
- Bersaglieri C, Santoro R. Genome Organization in and around the Nucleolus. *Cells*. 2019; 8.
- Weeks SE, Metge BJ, Samant RS. The nucleolus: a central response hub for the stressors that drive cancer progression. *Cell Mol Life Sci*. 2019; 76: 4511–24.
- Treré D, Ceccarelli C, Montanaro L, Tosti E, Derenzini M. Nucleolar size and activity are related to pRb and p53 status in human breast cancer. *J Histochem Cytochem*. 2004; 52: 1601–7.
- Russo A, Russo G. Ribosomal Proteins Control or Bypass p53 during Nucleolar Stress. *Int J Mol Sci*. 2017; 18.
- Peddibhotla S, Wei Z, Papineni R, Lam MH, Rosen JM, Zhang P. The DNA damage effector Chk1 kinase regulates Cdc14B nucleolar shuttling during cell cycle progression. *Cell Cycle*. 2011; 10: 671–9.
- Andrique L, Fauvin D, El Maassarani M, Colasson H, Vannier B, Séité P. ErbB3(80 kDa), a nuclear variant of the ErbB3 receptor, binds to the Cyclin D1 promoter to activate cell proliferation but is negatively controlled by p14ARF. *Cell Signal*. 2012; 24: 1074–85.
- Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, et al. Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. *Nat Med*. 2011; 17: 944–51.
- Carotenuto P, Pecoraro A, Palma G, Russo G, Russo A. Therapeutic Approaches Targeting Nucleolus in Cancer. *Cells*. 2019; 8.
- Bywater MJ, Poortinga G, Sanij E, Hein N, Peck A, Cullinane C, et al. Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell*. 2012; 22: 51–65.
- Quin JE, Devlin JR, Cameron D, Hannan KM, Pearson RB, Hannan RD. Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842: 802–16.
- Chan JC, Hannan KM, Riddell K, Ng PY, Peck A, Lee RS, et al. AKT promotes rRNA synthesis and cooperates with c-MYC to stimulate ribosome biogenesis in cancer. *Sci Signal*. 2011; 4: ra56.
- Wall M, Poortinga G, Stanley KL, Lindemann RK, Bots M, Chan CJ, et al. The mTORC1 inhibitor everolimus prevents and treats Eμ-Myc lymphoma by restoring oncogene-induced senescence. *Cancer Discov*. 2013; 3: 82–95.
- Stenström L, Mahdessian D, Gnann C, Cesnik AJ, Ouyang W, Leonetti MD, et al. Mapping the nucleolar proteome reveals a spatiotemporal organization related to intrinsic protein disorder. *Mol Syst Biol*. 2020; 16: e9469.
- Farhy C, Hariharan S, Ylanko J, Orozco L, Zeng F-Y, Pass I, et al. Improving drug discovery using image-based multiparametric analysis of the epigenetic landscape. *Elife*. 2019; 8.
- Mayank, Rani R, Singh A, Garg N, Kaur N, Singh N. Mitochondria- and nucleolus-targeted copper(I) complexes with pyrazole-linked triphenylphosphine moieties for live cell imaging. *Analyst*. 2019; 145: 83–90.
- Mukherjee T, Soppina V, Ludovic R, Mély Y, Klymchenko AS, Collot M, et al. Live-cell imaging of the nucleolus and mapping mitochondrial viscosity with a dual function fluorescent probe. *Org Biomol Chem*. 2021; 19: 3389–95.
- Martin RM, Herce HD, Ludwig AK, Cardoso MC. Visualization of the Nucleolus in Living Cells with Cell-Penetrating Fluorescent Peptides. *Methods Mol Biol*. 2016; 1455: 71–82.
- Benedetti L, Marvin JS, Falahati H, Guillén-Samander A, Looger LL, De Camilli P. Optimized Vivid-derived Magnets photodimerizers for subcellular optogenetics in mammalian cells. *Elife*. 2020; 9.
- Werner S, Engler C, Weber E, Gruetzner R, Marillonnet S. Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioeng Bugs*. 2012; 3: 38–43.
- Corman A, Sirozh O, Lafarga V, Fernandez-Capetillo O. Targeting the nucleolus as a therapeutic strategy in human disease. *Trends Biochem Sci*. 2023; 48: 274–87.
- Tan P, Hong T, Cai X, Li W, Huang Y, He L, et al. Optical control of protein delivery and partitioning in the nucleolus. *Nucleic Acids Res*. 2022; 50: e69.
- Gray NW, Weimer RM, Bureau I, Svoboda K. Rapid redistribution of synaptic PSD-95 in the neocortex in vivo. *PLoS Biol*. 2006; 4: e370.

24. Grusch M, Schelch K, Riedler R, Reichhart E, Differ C, Berger W, et al. Spatio-temporally precise activation of engineered receptor tyrosine kinases by light. *EMBO J.* 2014; 33: 1713–26.
25. van Bergeijk P, Adrian M, Hoogenraad CC, Kapitein LC. Optogenetic control of organelle transport and positioning. *Nature.* 2015; 518: 111–4.
26. Duan L, Che D, Zhang K, Ong Q, Guo S, Cui B. Optogenetic control of molecular motors and organelle distributions in cells. *Chem Biol.* 2015; 22: 671–82.
27. Lerner AM, Yumerefendi H, Goudy OJ, Strahl BD, Kuhlman B. Engineering Improved Photoswitches for the Control of Nucleocytoplasmic Distribution. *ACS Synth Biol.* 2018; 7: 2898–907.
28. Niopek D, Wehler P, Roensch J, Eils R, Di Ventura B. Optogenetic control of nuclear protein export. *Nat Commun.* 2016; 7: 10624.
29. van Haren J, Charafeddine RA, Ettinger A, Wang H, Hahn KM, Wittmann T. Local control of intracellular microtubule dynamics by EB1 photodissociation. *Nat Cell Biol.* 2018; 20: 252–61.
30. Shin Y, Berry J, Pannucci N, Haataja MP, Toettcher JE, Brangwynne CP. Spatiotemporal Control of Intracellular Phase Transitions Using Light-Activated optoDroplets. *Cell.* 2017; 168: 159–71.e14.
31. Dine E, Gil AA, Uribe G, Brangwynne CP, Toettcher JE. Protein Phase Separation Provides Long-Term Memory of Transient Spatial Stimuli. *Cell Syst.* 2018; 6: 655–63.e5.
32. Niopek D, Benzinger D, Roensch J, Draebing T, Wehler P, Eils R, et al. Engineering light-inducible nuclear localization signals for precise spatiotemporal control of protein dynamics in living cells. *Nat Commun.* 2014; 5: 4404.

## References

1. Engbrecht M, Mangerich A. The Nucleolus and PARP1 in Cancer Biology. *Cancers.* 2020; 12.
2. Bersaglieri C, Santoro R. Genome Organization in and around the Nucleolus. *Cells.* 2019; 8.
3. Weeks SE, Metge BJ, Samant RS. The nucleolus: a central response hub for the stressors that drive cancer progression. *Cell Mol Life Sci.* 2019; 76: 4511–24.
4. Treré D, Ceccarelli C, Montanaro L, Tosti E, Derenzini M. Nucleolar size and activity are related to pRb and p53 status in human breast cancer. *J Histochem Cytochem.* 2004; 52: 1601–7.
5. Russo A, Russo G. Ribosomal Proteins Control or Bypass p53 during Nucleolar Stress. *Int J Mol Sci.* 2017; 18.
6. Peddibhotla S, Wei Z, Papineni R, Lam MH, Rosen JM, Zhang P. The DNA damage effector Chk1 kinase regulates Cdc14B nucleolar shuttling during cell cycle progression. *Cell Cycle.* 2011; 10: 671–9.
7. Andrique L, Fauvin D, El Maassarani M, Colasson H, Vannier B, Séité P. ErbB3(80 kDa), a nuclear variant of the ErbB3 receptor, binds to the Cyclin D1 promoter to activate cell proliferation but is negatively controlled by p14ARF. *Cell Signal.* 2012; 24: 1074–85.
8. Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, et al. Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. *Nat Med.* 2011; 17: 944–51.
9. Carotenuto P, Pecoraro A, Palma G, Russo G, Russo A. Therapeutic Approaches Targeting Nucleolus in Cancer. *Cells.* 2019; 8.
10. Bywater MJ, Poortinga G, Sanij E, Hein N, Peck A, Cullinane C, et al. Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell.* 2012; 22: 51–65.
11. Quin JE, Devlin JR, Cameron D, Hannan KM, Pearson RB, Hannan RD. Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842: 802–16.
12. Chan JC, Hannan KM, Riddell K, Ng PY, Peck A, Lee RS, et al. AKT promotes rRNA synthesis and cooperates with c-MYC to stimulate ribosome biogenesis in cancer. *Sci Signal.* 2011; 4: ra56.
13. Wall M, Poortinga G, Stanley KL, Lindemann RK, Bots M, Chan CJ, et al. The mTORC1 inhibitor everolimus prevents and treats Eμ-Myc lymphoma by restoring oncogene-induced senescence. *Cancer Discov.* 2013; 3: 82–95.
14. Stenström L, Mahdessian D, Gnann C, Cesnik AJ, Ouyang W, Leonetti MD, et al. Mapping the nucleolar proteome reveals a spatiotemporal organization related to intrinsic protein disorder. *Mol Syst Biol.* 2020; 16: e9469.
15. Farhy C, Hariharan S, Ylanko J, Orozco L, Zeng F-Y, Pass I, et al. Improving drug discovery using image-based multiparametric analysis of the epigenetic landscape. *Elife.* 2019; 8.
16. Mayank, Rani R, Singh A, Garg N, Kaur N, Singh N. Mitochondria- and nucleolus-targeted copper(II) complexes with pyrazole-linked triphenylphosphine moieties for live cell imaging. *Analyst.* 2019; 145: 83–90.
17. Mukherjee T, Soppina V, Ludovic R, Mély Y, Klymchenko AS, Collot M, et al. Live-cell imaging of the nucleolus and mapping mitochondrial viscosity with a dual function fluorescent probe. *Org Biomol Chem.* 2021; 19: 3389–95.
18. Martin RM, Herce HD, Ludwig AK, Cardoso MC. Visualization of the Nucleolus in Living Cells with Cell-Penetrating Fluorescent Peptides. *Methods Mol Biol.* 2016; 1455: 71–82.
19. Benedetti L, Marvin JS, Falahati H, Guillén-Samander A, Looger LL, De Camilli P. Optimized Vivid-derived Magnets photodimerizers for subcellular optogenetics in mammalian cells. *Elife.* 2020; 9.
20. Werner S, Engler C, Weber E, Gruetzner R, Marillonnet S. Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioeng Bugs.* 2012; 3: 38–43.
21. Corman A, Sirozh O, Lafarga V, Fernandez-Capetillo O. Targeting the nucleolus as a therapeutic strategy in human disease. *Trends Biochem Sci.* 2023; 48: 274–87.
22. Tan P, Hong T, Cai X, Li W, Huang Y, He L, et al. Optical control of protein delivery and partitioning in the nucleolus. *Nucleic Acids Res.* 2022; 50: e69.
23. Gray NW, Weimer RM, Bureau I, Svoboda K. Rapid redistribution of synaptic PSD-95 in the neocortex in vivo. *PLoS Biol.* 2006; 4: e370.
24. Grusch M, Schelch K, Riedler R, Reichhart E, Differ C, Berger W, et al. Spatio-temporally precise activation of engineered receptor tyrosine kinases by light. *EMBO J.* 2014; 33: 1713–26.
25. van Bergeijk P, Adrian M, Hoogenraad CC, Kapitein LC. Optogenetic control of organelle transport and positioning. *Nature.* 2015; 518: 111–4.
26. Duan L, Che D, Zhang K, Ong Q, Guo S, Cui B. Optogenetic control of molecular motors and organelle distributions in cells. *Chem Biol.* 2015; 22: 671–82.
27. Lerner AM, Yumerefendi H, Goudy OJ, Strahl BD, Kuhlman B. Engineering Improved Photoswitches for the Control of Nucleocytoplasmic Distribution. *ACS Synth Biol.* 2018; 7: 2898–907.
28. Niopek D, Wehler P, Roensch J, Eils R, Di Ventura B. Optogenetic control of nuclear protein export. *Nat Commun.* 2016; 7: 10624.
29. van Haren J, Charafeddine RA, Ettinger A, Wang H, Hahn KM, Wittmann T. Local control of intracellular microtubule dynamics by EB1 photodissociation. *Nat Cell Biol.* 2018; 20: 252–61.
30. Shin Y, Berry J, Pannucci N, Haataja MP, Toettcher JE, Brangwynne CP. Spatiotemporal Control of Intracellular Phase Transitions Using Light-Activated optoDroplets. *Cell.* 2017; 168: 159–71.e14.
31. Dine E, Gil AA, Uribe G, Brangwynne CP, Toettcher JE. Protein Phase Separation Provides Long-Term Memory of Transient Spatial Stimuli. *Cell Syst.* 2018; 6: 655–63.e5.
32. Niopek D, Benzinger D, Roensch J, Draebing T, Wehler P, Eils R, et al. Engineering light-inducible nuclear localization signals for precise spatiotemporal control of protein dynamics in living cells. *Nat Commun.* 2014; 5: 4404.

## ДЛИННАЯ НЕКОДИРУЮЩАЯ РНК NEAT1\_1 СНИЖАЕТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ НЕЙРОННЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭПР-СТРЕССЕ

Н. Е. Пукаева<sup>1,2</sup>, В. Н. Залевская<sup>2</sup>, А. В. Дейкин<sup>3</sup>, М. И. Таубинская<sup>2</sup>, О. А. Кухарская<sup>2</sup>, Р. К. Овчинников<sup>1,2</sup>, А. И. Антохин<sup>1</sup>, М. С. Кухарский<sup>1,2</sup> ✉

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт физиологически активных веществ Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук, Черноголовка, Россия

<sup>3</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

Длинная некодирующая РНК NEAT1 играет важную роль в работе центральной нервной системы (ЦНС) и участвует в развитии ряда патологических состояний. Повышение уровня NEAT1 в мозге происходит при нейродегенеративных и психических заболеваниях. Какую роль играет такое повышение остается неясным. Функционально NEAT1 связывают с реализацией ответа на клеточный стресс в нервной системе. Целью работы было оценить влияние повышенного уровня короткой изоформы NEAT1\_1 на выживаемость первичных гиппокампальных культур мышей, при ЭПР-стрессе, индуцированном с помощью ингибитора протеасом MG132. Первичные культуры были получены от трансгенных животных, экспрессирующих NEAT1\_1 человека. Характеристику клеточного состава и оценку апоптоза проводили с помощью иммуноцитохимического окрашивания. Анализ экспрессии генов сигнальных путей апоптоза осуществляли методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Первичные нейронные культуры, полученные от трансгенных животных, не отличались от культур дикого типа по клеточному составу и морфологическим характеристикам нейронов. При индукции ЭПР-стресса происходило усиление апоптотической гибели клеток, в том числе нейронов, в культурах, экспрессирующих NEAT1\_1 в сравнении с культурами дикого типа. Активация генов сигнальных путей ЭПР-стресса *Atf4* и *Ddit3* была менее выражена в трансгенных культурах при стрессе. Кроме того, был снижен уровень экспрессии антиапоптотических генов *Bcl2l2* и *Mcl1*. Таким образом, повышенный уровень NEAT1\_1 в первичных нейронных культурах усиливает апоптотическую гибель клеток при ЭПР-стрессе.

**Ключевые слова:** длинные некодирующие РНК, NEAT1\_1, ЭПР-стресс, первичные нейронные культуры, апоптоз

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 22-25-00645.

**Благодарности:** авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования ИФАВ РАН (FFSN-2021-0005 (2021–2023) за предоставленную возможность проведения экспериментов с использованием лабораторных животных.

**Вклад авторов:** Н. Е. Пукаева — проведение экспериментов на клеточных культурах, анализ клеточной гибели; В. Н. Залевская — работа с клеточными культурами; А. В. Дейкин — получение трансгенной линии мышей; М. И. Таубинская — работа с клеточными культурами, анализ морфологии нейронов, О. А. Кухарская — работа с клеточными культурами, анализ клеточной гибели; Р. К. Овчинников — анализ и интерпретация результатов, подготовка текста рукописи; А. И. Антохин — редактирование рукописи; М. С. Кухарский — планирование исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка и редактирование статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ИФАВ ФГБУН ФИЦ ПХФ и МХ РАН (протокол № 53 от 18 декабря 2020 г.); работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации» от 2016 г.

✉ **Для корреспонденции:** Михаил Сергеевич Кухарский  
ул. Островитянова, д. 1, стр. 9, г. Москва, 117997, Россия; kukharskym@rsmu.ru

**Статья получена:** 08.11.2023 **Статья принята к печати:** 16.12.2023 **Опубликована онлайн:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.053

## NEAT1\_1 LONG NON-CODING RNA REDUCES THE SURVIVAL OF PRIMARY NEURONAL CELLS UNDER ER-STRESS

Pukaeva NE<sup>1,2</sup>, Zalevskaya VN<sup>2</sup>, Deykin AV<sup>3</sup>, Taubinskaya MI<sup>2</sup>, Kukharskaya OA<sup>2</sup>, Ovchinnikov RK<sup>1,2</sup>, Antohin AI<sup>1</sup>, Kukharsky MS<sup>1,2</sup> ✉

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Physiologically Active Compounds at Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia

<sup>3</sup> Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

NEAT1 long non-coding RNAs play an important role in the central nervous system (CNS) and are associated with a number of pathological conditions. Increased levels of NEAT1 in the brain have been observed in neurodegenerative and psychiatric diseases — the significance of such an increase is still poorly understood. Functionally, NEAT1 is associated with cellular stress pathways in the nervous system. The aim of the current study was to evaluate the effect of increased levels of the short isoform NEAT1\_1 on survival of mice primary hippocampal cultures under ER-stress induced by MG132 proteasome inhibitor. Primary cultures were obtained from transgenic animals expressing human NEAT1\_1. Cellular composition and apoptosis were assessed using immunocytochemical staining. The expression of apoptosis signaling pathway genes was analyzed by quantitative PCR with reverse transcription. No differences in cellular composition and morphological characteristics of neurons were observed in primary neuronal cultures obtained from transgenic animals as compared to wild type cultures. Induction of ER-stress resulted in a more significant increase in apoptotic death of cells including neurons in NEAT1\_1 expressing cultures in comparison with the wild type cultures. ER-stress signaling pathway genes *Atf4* and *Ddit3* were less expressed in transgenic cultures under stress. Expression of *Bcl2l2* and *Mcl1* anti-apoptotic genes was reduced as well. Thus, high levels of NEAT1\_1 in primary neuronal cultures increased apoptotic cell death under ER-stress.

**Keywords:** long non-coding RNAs, NEAT1\_1, ER-stress, primary neuronal cultures, apoptosis

**Funding:** The study was supported by the Russian Science Foundation, Project No. 22-25-00645.

**Acknowledgements:** Authors would like to express their gratitude to FRC PCP MC RAS Collective Use Center (FFSN-2021-0005 (2021 – 2023) for providing the opportunity to conduct experiments using laboratory animals.

**Author contribution:** Pukaeva NE — cell culture experiments, apoptosis data analysis, Zalevskaya VN — cell culture experiments, Deykin AV — generating transgenic mice, Taubinskaya MI — cell culture experiments, neuron morphology analysis, Kukharskaya OA — cell culture experiments, cell death analysis, Ovchinnikov RK — data analysis, manuscript writing, Antohin AI — manuscript editing, Kukharsky MS — study design, data analysis, manuscript writing and editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the FRC PCP MC RAS (Protocol № 53 dated December 18, 2020); animal experimental work was carried out in accordance with the Rules of Good Laboratory Practice in the Russian Federation (2016).

✉ **Correspondence should be addressed:** Michail S. Kukharsky  
Ostrovitianova, 1/9, Moscow, 117997, Russia; kukharskym@rsmu.ru

**Received:** 08.11.2023 **Accepted:** 16.12.2023 **Published online:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.053

Длинные некодирующие РНК (днРНК) — это молекулы длиной более 200 нуклеотидов, не имеющие открытых рамок считывания [1]. днРНК участвуют в различных физиологических и патологических процессах, таких как регуляция клеточного цикла, дифференцировка, апоптоз и воспаление [2]. Особое значение отводится роли днРНК в эволюции мозга млекопитающих и человека. В пользу этого говорит тот факт, что около 40% всех идентифицированных днРНК человека специфично экспрессируются в мозге [3]. В многочисленных исследованиях было продемонстрировано участие днРНК в развитии нервной системы, нейрональной пластичности, а также в патогенезе неврологических заболеваний [4]. Одной из таких днРНК, для которой убедительно показана связь с развитием патологических состояний нервной системы, является NEAT1 (от англ. nuclear enriched abundant transcript 1). Изменение уровня NEAT1 в мозге происходит при ряде нейродегенеративных заболеваний и психических расстройств, таких как боковой амиотрофический склероз (БАС), фронтотемпоральная деменция (ФТД), хорея Гентингтона (ХГ), болезнь Альцгеймера (БА), шизофрения [5]. Причем в большинстве случаев обнаружено повышение ее уровня в головном мозге пациентов с данными заболеваниями [6–8]. Остается неясным, какую роль играет такое повышение, протекторную или патогенетическую. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что *NEAT1* является стресс-активируемым геном и повышает свою экспрессию в ответ на патологические воздействия стрессового характера на клеточном уровне [9, 10]. На основе гена *NEAT1* образуются две изоформы РНК: короткая NEAT1\_1 (3,7 т.п.о.) и длинная NEAT1\_2 (23 т.п.о.), последовательность которых перекрывается на 5'-конце молекулы [5]. Накопление длинной изоформы NEAT1\_2 в клетках нервной системы человека подтверждено только при развитии БАС [11, 12]. По-видимому, для других заболеваний нарушение функций NEAT1 связано с изменением уровня ее короткой изоформы (NEAT1\_1) [13]. В нервной ткани мышей в норме длинная изоформа не обнаружена, тогда как короткая экспрессируется во всех отделах ЦНС [14].

В физиологических условиях эндоплазматический ретикулум (ЭПР) является центральным субклеточным компартментом контроля качества белков, в котором происходят их правильная укладка, созревание и деградация [15]. При нарушении этих процессов и накоплении несвернутых или неправильно свернутых белков развивается особый тип клеточного стресса – ЭПР-стресс [16]. Это наиболее общее патологическое событие на клеточном уровне развивается в нервных клетках, которые находятся в зоне поражения при нейродегенерации [17]. В случае невозможности восстановления белкового гомеостаза адаптивные программы клетки смещаются в сторону индукции апоптотической сигнализации, что ведет к гибели необратимо поврежденных нейронов [18].

NEAT1 участвует в клетке в образовании специфических рибонуклеопротеиновых комплексов [6, 11, 13]. В состав последних входят белки, такие как TDP-43 и FUS, патологическая агрегация которых приводит к развитию ЭПР-стресса и гибели нервных клеток. Агрегацию TDP-43 и FUS в нервной системе обнаруживают при БАС, ФТД, БА и других нейродегенеративных заболеваниях. Прямое взаимодействие NEAT1 с такими белками ставит вопрос о возможном влиянии этой РНК на развитие процесса патологической агрегации и клеточной гибели [12, 13].

В данной работе мы исследовали влияние повышенного уровня днРНК NEAT1\_1 на выживаемость клеток в

первичных культурах гиппокампа, полученных от трансгенных мышей, при ЭПР-стрессе, индуцированном ингибитором протеасом MG132.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Первичные культуры гиппокампа

Исследование выполняли на первичных нейронных культурах, полученных от трансгенных мышей NEAT1\_1Tg, экспрессирующих в нервной системе короткую изоформу NEAT1\_1 человека. Мыши данной линии были получены методом трансгенеза, как описано ранее [19], и несут в геноме трансген, кодирующий NEAT1\_1 человека, под контролем паннейронального промотора *Thy1* на генетическом фоне линии C57Bl/6J (в печати). Наличие трансгена у животных подтверждали ПЦР-анализом. Животных содержали в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 ч светлого и 12 ч темного времени) со свободным доступом к воде и корму.

Первичные культуры нейронов получали из гиппокампа трансгенных мышей NEAT1\_1Tg и контрольных мышей дикого типа (WT) на третий день после рождения (P3), как описано ранее [20]. Для получения культуры использовали гиппокампы, выделенные не менее чем от трех животных одного генотипа, каждый эксперимент независимо повторяли, как минимум, дважды. Проводили диссекцию гиппокампов, далее образцы инкубировали в растворе 0,1%-го трипсина в солевом растворе Хенкса (HBSS) с 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) и 1 mM пирувата натрия в течение 40 мин. После этого осуществляли механическую диссоциацию в растворе среды Нейробазальная («ПанЭко»; Россия), содержащей 50 ед./мл пенициллина/стрептомицина, 0,2% бета-меркаптоэтанола, 500 мкМ L-глутамина, 0,36% глюкозы и 10% лошадиной сыворотки. Образцы центрифугировали 5 мин при 1500 об./мин. Осадок ресуспендировали в свежеприготовленной среде, производили подсчет клеток в камере Горяева с использованием красителя трипанового синего. В среду вносили добавку B27 (Thermo Fisher Scientific; США) или НейроМакс («ПанЭко»; Россия), для повышения выживаемости первичных нейронов в культуре. Затем клетки высевали на покровное стекло диаметром 12 мм, покрытые поли-L-лизинном. На каждое стекло приходилось около  $3 \times 10^4$  клеток. На следующий день меняли среду на свежую без сыворотки. Последующую смену среды проводили через 3 дня, заменяя только половину объема на свежую. Культуры поддерживали в инкубаторе при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и относительной влажности 95%. Анализ культур проводили через 7 дней после посева.

Для индукции стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР-стресса) клетки обрабатывали раствором ингибитора протеасом MG132 («Sigma-Aldrich»; США) в ДМСО («ПанЭко»; Россия) с конечной концентрацией в среде 200 мкМ или 10 мкМ.

Для визуализации тела нейронов и сети отростков для последующего Sholl-анализа проводили иммуноцитохимическую окраску на белок Tau, ассоциированный с микротрубочками (антитела SAB4300377; Sigma-Aldrich, США), для подтверждения нейронного фенотипа клетки параллельно окрашивали на маркер NeuN (антитела MAB377; Millipore, США). Получали микрофотографии с использованием микроскопа Carl Zeiss Axio Observer 3 (Германия), оснащенный камерой AxioCam 712 mono (Carl Zeiss; Германия). Полуавтоматический

Sholl-анализ проводили в программе ImageJ, как описано ранее [10]. Было проанализировано по 30 нейронов для каждого генотипа.

### Иммуноцитохимическое окрашивание

Для характеристики клеточного состава первичных нейронных культур проводили иммуноцитохимическое окрашивание на маркеры основных типов клеток нервной ткани: NeuN — маркер дифференцированных нейронов (антитела MAB377; Millipore, США), GFAP — маркер астроцитов (антитела G9269; Sigma-Aldrich, США), Olig2 — маркер олигодендроцитов (антитела ab109186; Abcam, Великобритания) и Iba1 — маркер микроглиоцитов (антитела ab178846; Abcam, Великобритания). Для каждого маркера было проанализировано шесть стекол, полученных от двух независимых культур для каждого генотипа. Оценку апоптотической гибели клеток проводили с помощью окрашивания антителами к активированной форме каспазы 3, CC3 (антитела AV3623; Sigma-Aldrich, США). Клетки отмывали от среды 1 × ФСБ (фосфатно-солевой буфер), фиксировали 4%-м параформальдегидом в течение 15 мин и проводили пятиминутную пермеабиллизацию холодным метанолом. Блокирование неспецифического связывания проводили в растворе 5%-й сыворотки козла в ФСБ-Твин 20 в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее покровные стекла инкубировали с первичными антителами, в разведении 1 : 1000 в блокирующем растворе, в течение 1 ч при комнатной температуре. Промывали 1 × ФСБ и проводили инкубацию с вторичными флуоресцентно-мечеными антителами Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor™ 568 (A-11011; Thermo Fisher Scientific, США) и Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor™ 488 (A-11029; Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1 : 1000 в растворе ФСБ-Твин 20, в течение 90 мин при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали с помощью раствора DAPI (Sigma-Aldrich; США). Покровные стекла монтировали на предметные стекла, в каплю среды Immu-Mount (Thermo Fisher Scientific; США). Для анализа типов клеток и апоптоза проводили съемку препаратов на приборе Cytation 3 (BioTek; США), с программным обеспечением Gen5 3.08 (BioTek; США). Сканировали область размером не менее чем 3000 × 3000 мкм в мультисканальном флуоресцентном режиме. Отсканированную область сшивали в единое панорамное изображение и анализировали количество клеток, окрашенных на специфичный маркер. Результаты для каждого маркера нормализовали относительно общего числа клеток, которое оценивали путем подсчета ядер, окрашенных DAPI.

Таблица. Последовательности праймеров для ОТ-кПЦР

Название праймера	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
<i>B2m</i>	CATGGCTCGCTCGGTGAC	CAGTTCAGTATGTTCCGGCTTCC
<i>Atf4</i>	GGGTTCTGTCTTCCACTCCA	AAGCAGCAGAGTCAGGCTTTC
<i>Ddit3</i>	CCACCACACCTGAAAGCAGAA	AGGTGAAAGGCAGGGACTCA
<i>Hspa5</i>	TCGACTTGGGGACCACCTAT	AGTGAAGGCCACATACGACG
<i>Emc4</i>	ATACCAGCGTGCAAGAGACC	GGAATCTGCTTGAGGGGACC
<i>Bcl2l1</i>	CGGATTGCAAGTTGGATGGC	TGCTGCATTGTTCCCGTAGA
<i>Bcl2l2</i>	ATTGGATGGTGGCCTACCTG	CCCGTATAGAGCTGTGAAGCTCC
<i>Mcl1</i>	AACGGGACTGGCTTGCAAA	CTGATGCCGCCTTCTAGGTC
<i>Casp3</i>	CGGGGAGCTTGGAAACGGTA	CCACTGACTTGCTCCCATGT

### Анализ экспрессии генов

Оценку экспрессии генов, основных сигнальных путей ЭПР-стресса и апоптоза проводили методом количественной ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР) на приборе CFX96 (Bio-Rad; США). Клетки выращивали на шестилуночном планшете в течение 7 дней. Выделение тотальной РНК проводили с помощью реагента ExtractRNA («Евроген»; Россия), согласно протоколу производителя. Далее пробы РНК обрабатывали ДНКазой (Sigma-Aldrich; США), по протоколу производителя. Концентрацию очищенной РНК измеряли с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Далее проводили синтез комплементарной цепи (кДНК) с использованием набора «Обратная транскриптаза Magnus» («Евроген»; Россия) согласно протоколу производителя. Количественную ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad; США) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген»; Россия) согласно протоколу производителя. В качестве эндогенного контроля использовали ген бета-2 микроглобулина (*B2m*). Список использованных праймеров представлен в таблице.

Программа для кПЦР включала первичную денатурацию в течение 5 мин при 95 °С, затем 40 циклов: 20 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, 30 с при 68 °С. Результаты анализировали с помощью программы Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad; США).

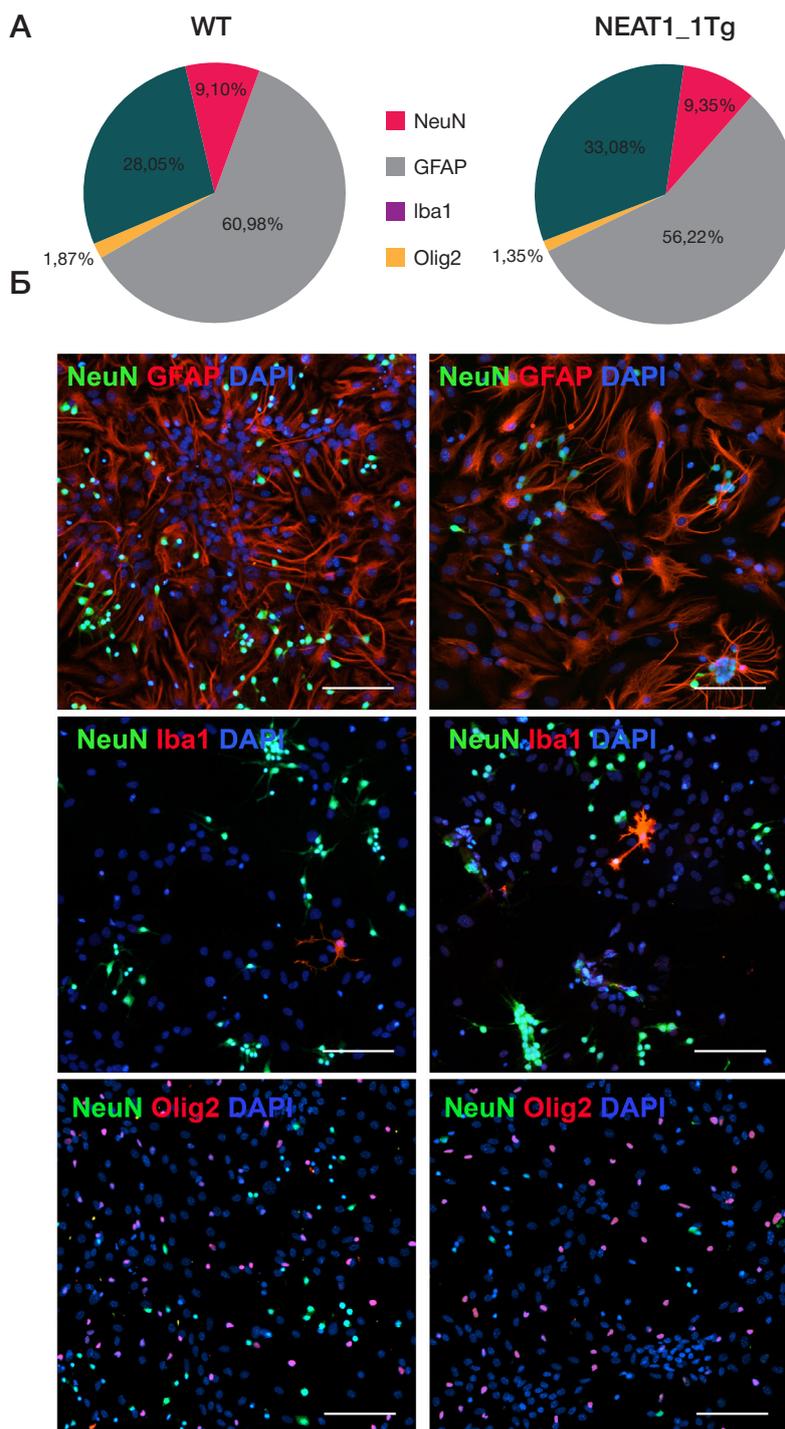
### Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью программных пакетов Statistica 12.0 (StatSoft, Inc.; США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software; США). Во всех случаях результаты представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ( $\bar{x} \pm m$ ) с указанием индивидуальных значений, где это целесообразно. Детали статистического анализа для каждой группы данных представлены в описании к рисункам. Различия полученных результатов считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Первичные нейронные культуры, экспрессирующие NEAT1\_1, не отличаются по клеточному составу и морфологии нейронов от контрольных

В эксперименте были использованы первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от трансгенных мышей

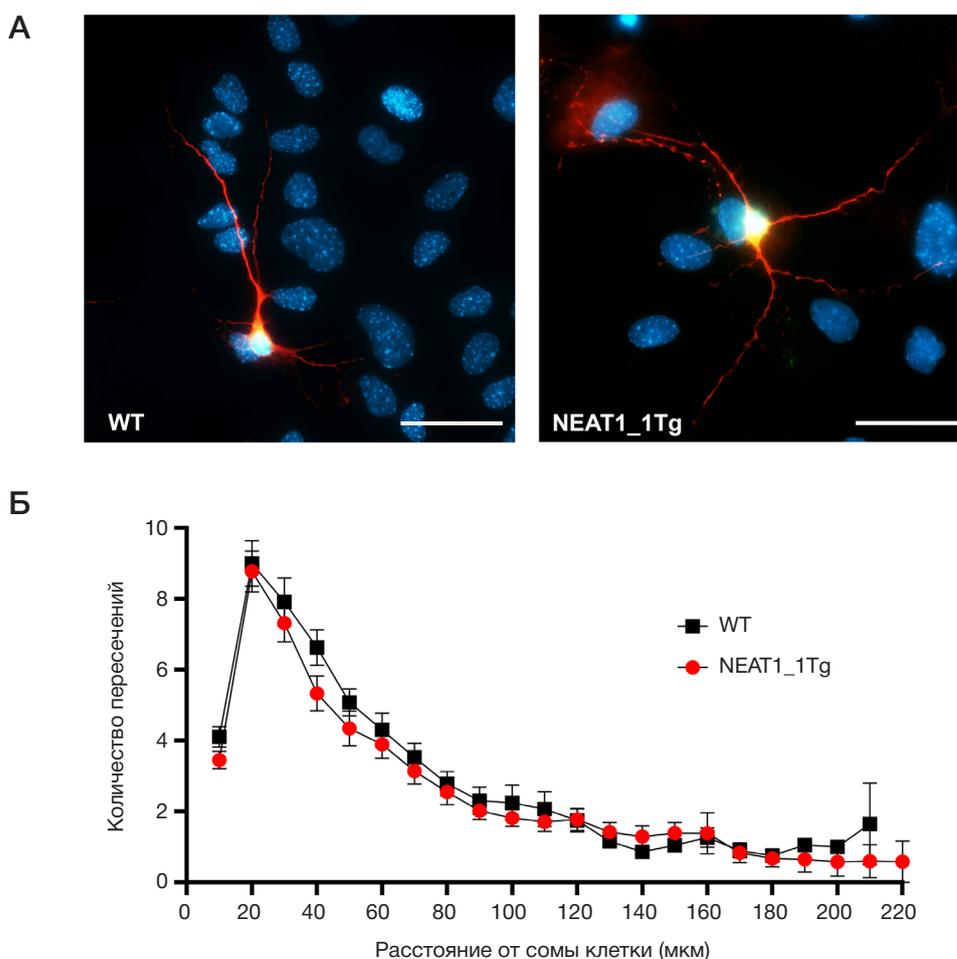


**Рис. 1.** Характеристика первичных культур гиппокампа, полученных от трансгенных мышей (NEAT1\_1Tg) и мышей дикого типа (WT), по клеточному составу. **А.** Процентное содержание нейронов (NeuN), астроцитов (GFAP), микроглиоцитов (Iba1) и олигодендроцитов (Olig2) в первичных культурах. **Б.** Репрезентативные фотографии первичных культур, окрашенных на маркеры разных типов клеток. Ядра клеток окрашены DAPI. Масштабный отрезок — 100 мкм

NEAT1\_1Tg и от животных дикого типа (WT) на третий день постнатального развития (P3). Выделенные клетки культивировали *in vitro* на протяжении 7 дней. Условия культивирования (использование сыворотки, питательной добавки B27 и др.) были подобраны таким образом, чтобы получить смешанную культуру, содержащую все основные типы клеток, характерные для нервной ткани. Характеристика клеточного состава культур с помощью окраски на маркеры основных типов клеток показала, что полученные первичные нейронные культуры содержали около  $9 \pm 1,3\%$  нейронов,  $61 \pm 5,6\%$  астроцитов,  $28 \pm 2,5\%$  олигодендроцитов и  $2 \pm 0,5\%$  микроглиоцитов

(рис. 1А, Б). Различий между культурами клеток разного генотипа NEAT1\_1Tg и WT по клеточному составу обнаружено не было.

Для морфологической характеристики нейронов и оценки влияния повышенной экспрессии NEAT1\_1 на морфофункциональные характеристики, связанные с активностью и пластичностью этих клеток, был проведен Sholl-анализ, который позволяет оценить разветвленность сети нейритов. Значимых различий в разветвленности отростков у нейронов разного генотипа (NEAT1\_1Tg и WT) выявлено не было, хотя отмечена тенденция к снижению числа отростков в проксимальной области сети у нейронов



**Рис. 2.** Морфофункциональная характеристика первичных нейронов. **А.** Репрезентативные фотографии нейронов дикого типа (WT) и трансгенных нейронов (NEAT1\_1Tg). Иммуноцитохимическая окраска на белок Tau (показано красным), ассоциированный с микротрубочками, маркер нейронов NeuN (показано зеленым), ядра клеток окрашены DAPI. Масштабный отрезок — 50 мкм. **Б.** Анализ разветвленности отростков первичных нейронов (Sholl-анализ). На графике отражено среднее количество пересечений условных окружностей заданного радиуса с отростками. Множественный *t*-тест с поправкой Холма–Сидака

из трансгенных NEAT1\_1Tg-культур (рис. 2А, Б). Таким образом экспрессия NEAT1\_1 не оказывает выраженного влияния на пластичность нейронов.

### В трансгенных NEAT1\_1Tg-культурах выявлена более выраженная апоптотическая гибель при ЭПР-стрессе

Анализ апоптотической гибели клеток методом иммуноцитохимического окрашивания к активированной каспазе 3 (CC3) показал, что при обычных условиях в культурах выявляется небольшое количество (2–4%) CC3-позитивных (CC3+) клеток, при этом сигнал в основном не колокализовался с маркером NeuN, что говорит о глиальной природе гибнущих клеток (рис. 3А–В).

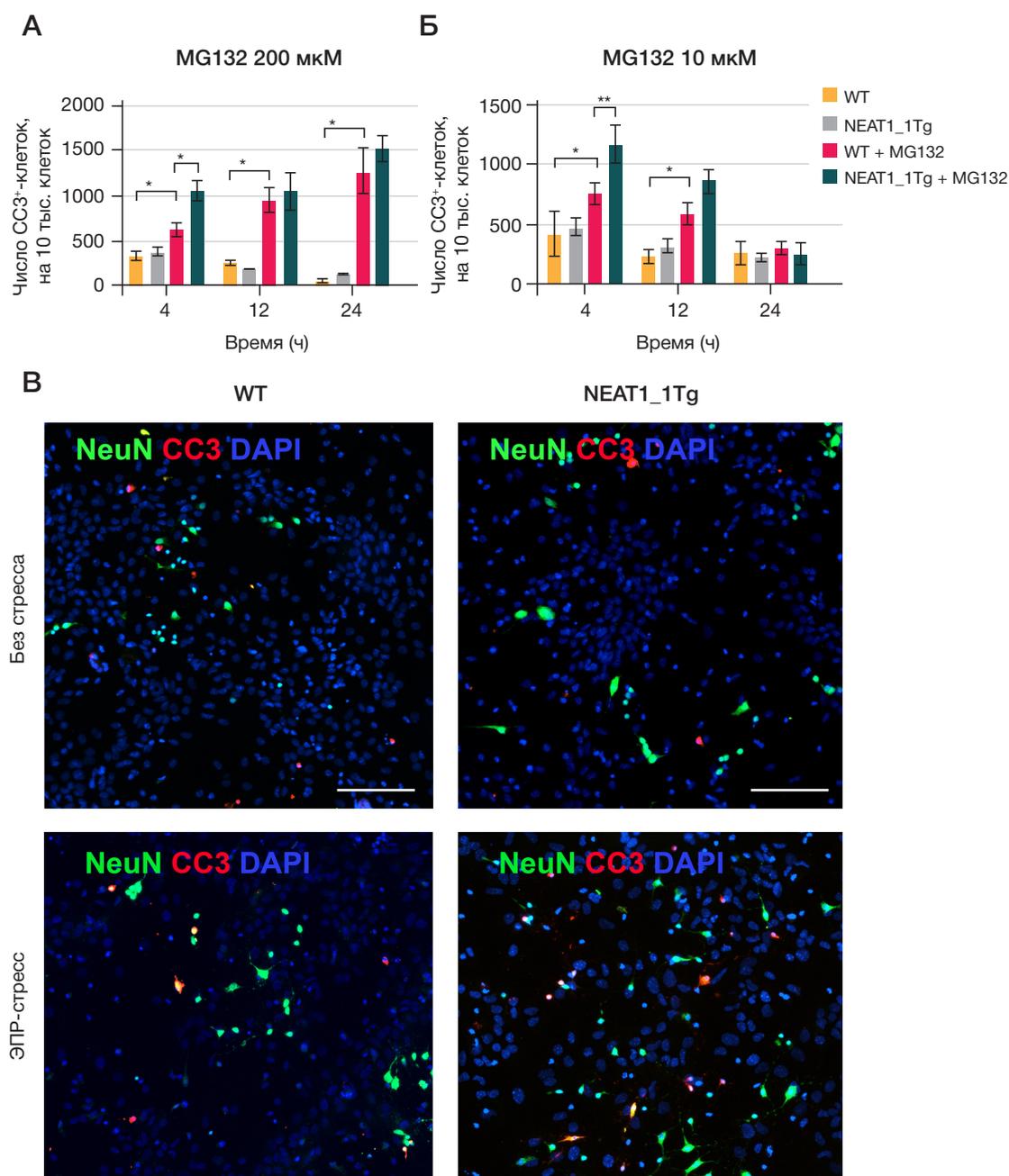
Далее в культурах клеток индуцировали острый и умеренный ЭПР-стресс обработкой ингибитором протеасом MG132 в концентрации 200 мкМ и 10 мкМ соответственно. На седьмой день культивирования в среду вносили ингибитор протеасом MG132 на 4 ч, после чего воздействие вещества снимали путем смены среды. Далее оценивали уровень апоптоза в культуре через 4, 12 и 24 ч. При этом анализировали общую клеточную гибель, т. е. подсчитывали все CC3+ клетки без учета их принадлежности к нейронам или глие.

При остром ЭПР-стрессе, вызванном высокой концентрацией MG132 (200 мкМ) в WT-культурах, выраженная гибель клеток детектировалась уже через

4 ч после обработки. Число гибнущих в результате апоптоза клеток было еще больше через 12 ч и сохранялось таким же высоким через 24 ч. При этом в культурах, полученных от трансгенных животных, обнаруживалось значимо большее число гибнущих при апоптозе клеток через 4 ч после обработки, тогда как в последующие временные точки этот показатель был сравним с WT-культурами, обработанными MG132 (рис. 3А).

Для моделирования умеренного транзистентного ЭПР-стресса использовали низкую концентрацию MG132 (10 мкМ). В таких условиях общая апоптотическая гибель также увеличивалась через 4 ч, однако к 12 ч количество CC3+ клеток снижалось, а к 24 ч соответствовало значениям для контрольных культур без обработки MG132, что свидетельствует о восстановлении клеточных культур после стресса. В NEAT1\_1Tg-культурах в сравнении с WT после стресса количество апоптотических клеток было больше через 4 ч после обработки, и такая же тенденция сохранялась на 12 ч, тогда как на 24 ч разница нивелировалась (рис. 3Б).

Для оценки того как ЭПР-стресс влияет на выживаемость нейронов, проводили совместную окраску на CC3 и маркер дифференцированных нейронов NeuN, после чего подсчитывали клетки, экспрессирующие оба маркера. В культурах с высокой концентрацией MG132 пик гибели нейронов приходился на 4 ч (рис. 4А), тогда как при низкой концентрации MG132 — на 12 ч (рис. 4Б).



**Рис. 3.** Апоптотическая гибель в трансгенных (NEAT1\_1Tg) первичных культурах и культурах дикого типа (WT). **А.** Апоптоз в культурах при обработке 200 мкМ MG132. **Б.** Апоптоз в культурах при обработке 10 мкМ MG132. Двухфакторный дисперсионный анализ, тест Фишера. \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ . **В.** Репрезентативные фотографии клеточных культур при обработке 10 мкМ MG132 через 12 ч. Нейроны окрашены на маркер дифференцированных нейронов NeuN (показано зеленым), маркер апоптотической гибели клеток — активированная каспаза 3, CC3 (показано красным), ядра окрашены DAPI (показано синим). Масштабный отрезок — 100 мкм

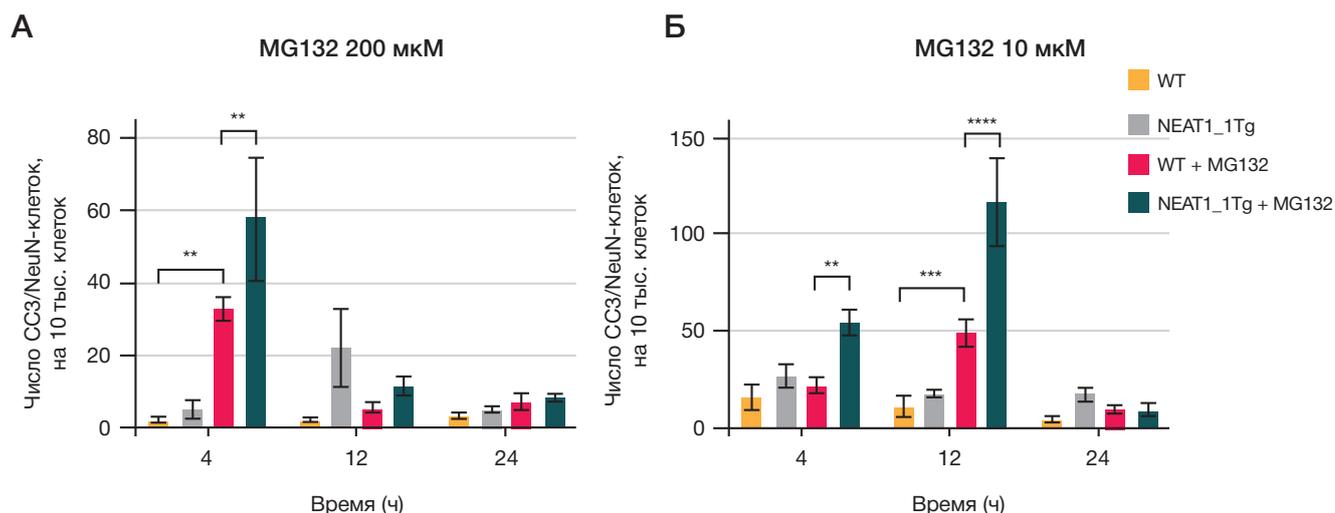
При этом в каждом случае гибель нейронов была значимо выше в культурах, экспрессирующих трансген NEAT1\_1Tg.

### В трансгенных NEAT1\_1Tg-культурах изменен ответ на ЭПР-стресс

Для определения возможного механизма повышенной гибели клеток, и в частности нейронов, в трансгенных нейронных культурах, экспрессирующих NEAT1\_1 человека, был проведен анализ экспрессии генов, участников сигнальных путей реализации клеточного ответа на ЭПР-стресс, а также генов апоптоза. Показано, что через 4 ч после обработки клеточных культур 10 мкМ MG132 происходит повышение экспрессии генов-маркеров ЭПР-стресса: транскрипционного фактора

*Atf4*, проапоптотического гена *Chop* (*Ddit3*), шаперона *Hspa5* (*Grp78* или *BiP*) (рис. 5А–В). Аналогичные изменения экспрессии данных генов происходили в трансгенных культурах после обработки MG132. В то же время уровни экспрессии *Atf4* и *Ddit3* не достигали уровня, наблюдаемого в WT-культурах после индукции ЭПР-стресса. Уровень экспрессии гена, кодирующего белок ЭПР *Emc4*, который обладает протекторными свойствами при стрессе [21], был значимо снижен в культурах NEAT1\_1Tg как в нормальных условиях, так и при ЭПР-стрессе (рис. 5Г).

Уровень мРНК гена каспазы 3 (*Casp3*) не различался между трансгенными и контрольными культурами и не изменялся в ответ на стресс (рис. 5Д). Анализ экспрессии известных генов-ингибиторов (*Bcl2l1*, *Bcl2l2*, *Mcl1*) апоптоза (рис. 5Е–З) показал, что индукция умеренного



**Рис. 4.** Апоптотическая гибель нейронов в трансгенных (NEAT1\_1Tg) первичных культурах и культурах дикого типа (WT). **А.** Апоптоз при обработке культур 200 мкМ MG132. **Б.** Апоптоз при обработке культур 10 мкМ MG132. Двухфакторный дисперсионный анализ, тест Фишера. \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* —  $p < 0,0001$

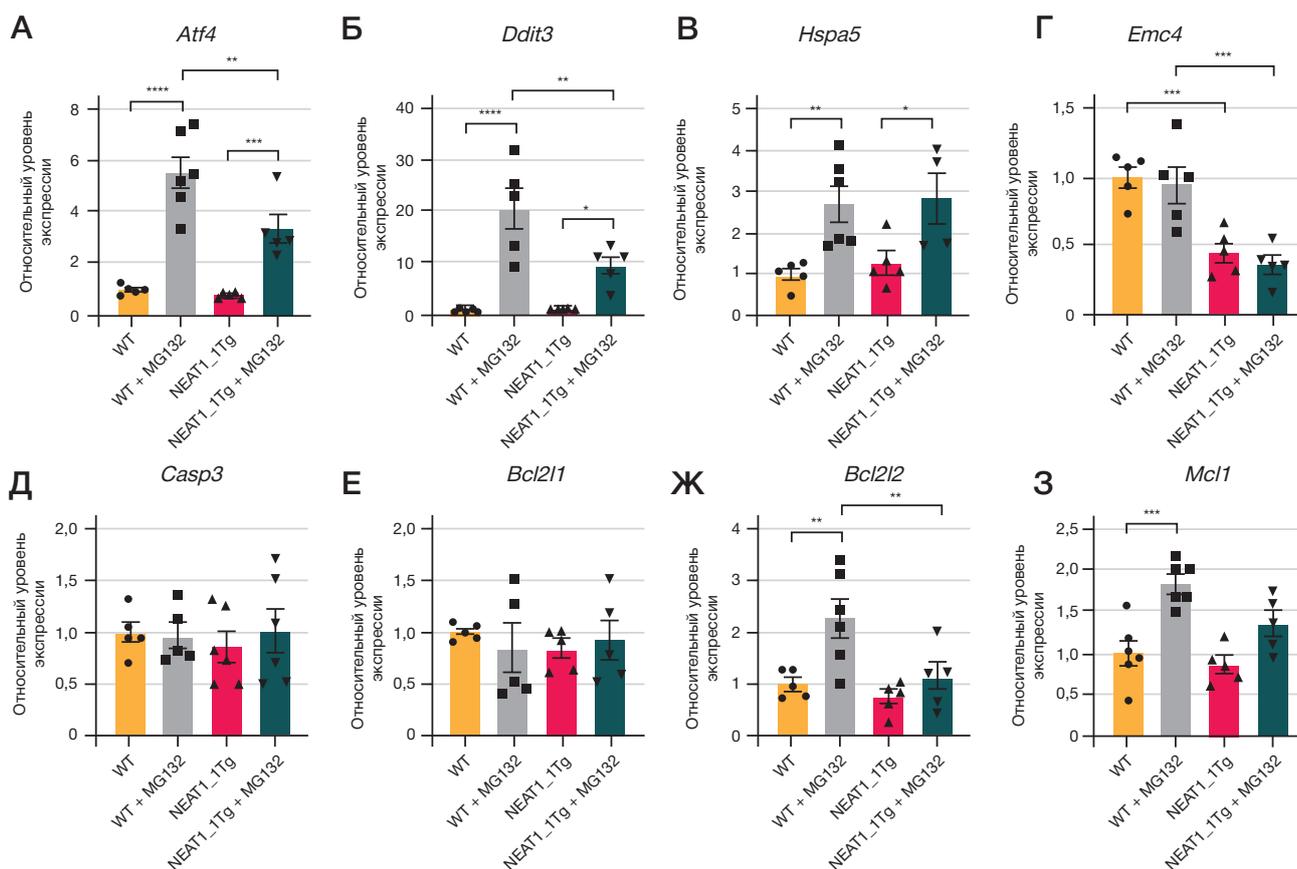
ЭПР-стресса в WT-культурах приводит к повышению уровня мРНК генов *Bcl2l2* и *Mcl1*, тогда как экспрессия *Bcl2l1* остается неизменной. В трансгенных NEAT1\_1Tg-культурах, в отличие от этого, при стрессе не наблюдалось значимой активации *Bcl2l2* и *Mcl1*, хотя для последнего имел место тренд к повышению.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для NEAT1 убедительно показано участие в различных патологических процессах, связанных с нейродегенерацией, включая нейровоспаление и апоптоз [5]. Промотор гена *NEAT1* имеет сайт связывания с белком р53, который способен повышать уровень NEAT1 [22]. Большое количество экспериментальных данных указывает на протекторную роль NEAT1. В экспериментах на мышах с использованием аденовирусного вектора для доставки РНК было показано, что *Neat1\_1* обладает антиапоптотическим эффектом на модели травмы мозга, а также на клеточной культуре нейронов гиппокампов мышей HT-22 в условиях гипоксии и недостатка глюкозы [23]. Нокадаун *NEAT1* в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y повышал апоптотическую гибель при имитации вирусной инфекции с помощью обработки двуцепочечной РНК [12]. В то же время сверхэкспрессия NEAT1 способна стимулировать ферроптоз в клетках гепатокарциномы HepG2 [24], а ингибирование NEAT1 в токсических (МФП<sup>+</sup>) клеточных и животных моделях болезни Паркинсона приводило к снижению гибели клеток и проапоптотических маркеров [25, 26]. Таким образом существуют противоречивые данные о влиянии NEAT1 на гибель клеток. Возможно, что конкретный про- или антиапоптотический эффект NEAT1 зависит от типа повреждающего воздействия, которое оказывается на них. Понимание механизма действия NEAT1 осложнено еще и тем, что, в отличие от нервной ткани *in vivo* и первичных нейронов, в большинстве культур клеток дополнительно к короткой изоформе экспрессируется еще и длинная изоформа (NEAT1\_2), которая служит основой для сборки параспеклов [5, 12]. Образование параспеклов, в свою очередь, может быть стимулировано клеточным стрессом разного типа, в том числе при ингибировании протеасом [27]. Поэтому сложно выделить независимые функции короткой и длинной изоформ NEAT1 при реализации клеточного ответа на стресс.

Нами показано, что эктопная экспрессия трансгена, кодирующего короткую изоформу NEAT1\_1 человека в нервной системе мышей, не влияет на клеточный состав (рис. 1) и морфологию первичных нейронных культур (рис. 2), полученных из гиппокампов. Индукция ЭПР-стресса с помощью ингибитора протеасом MG132 приводила к апоптотической гибели клеток первичной культуры (рис. 3), и выраженность такой гибели зависела от силы стресса (концентрации MG132). При этом в культурах, экспрессирующих трансген NEAT1\_1, количество апоптотических клеток было больше в сравнении с клетками WT в условиях стресса. Как ранее было показано на нокаутных по гену *Neat1* эмбриональных фибробластах мыши, отсутствие *Neat1* повышает гибель этих клеток в ответ на обработку MG132 [27]. Возможно, что для выживания клеток при стрессе важен определенный стабильный уровень *Neat1* либо ее влияние на гибель зависит от типа клеток. Первичная культура, которую мы использовали в данном исследовании, была смешанной и содержала как нейроны, так и глиальные клетки. Это позволяет учитывать в эксперименте выживаемость нейронов в условиях взаимного влияния разных популяций клеток нейронного происхождения. Для того чтобы определить специфичное влияние повышения уровня NEAT1\_1 на выживаемость нейронов, мы оценили количество клеток, экспрессирующих одновременно маркер зрелых нейронов NeuN и активированную каспазу 3 (CC3). Стресс приводил к более выраженной гибели нейронов в трансгенных культурах (NEAT1\_1Tg) по сравнению с культурами дикого типа (WT) (рис. 4). Таким образом, экспрессия NEAT1\_1 усиливает апоптоз первичных нейронов при ЭПР-стрессе. Обращает на себя внимание тенденция к увеличению количества апоптотических нейронов в трансгенных культурах без обработки в сравнении с контрольными культурами, которая проявляется на всех временных точках. Хотя данные различия и не достигали статистической значимости можно предположить, что существует некоторая предрасположенность трансгенных нейронов к запуску апоптоза в нормальных условиях. Этот факт требует дальнейшего исследования.

Реакция ЭПР-стресса в клетке реализуется через три основные сигнальные пути, в основе которых лежат киназы, играющие роль сенсоров стресса: PERK, ATF6 и IRE1 [16]. При их активации в клетке тормозится общий синтез



**Рис. 5.** Изменения экспрессии генов в трансгенных (NEAT1\_1Tg) первичных культурах и культурах дикого типа (WT) при обработке 10 мкМ MG132. **А-Г.** Экспрессия генов, связанных с ЭПР-стрессом. **Д-З.** Экспрессия генов, связанных с апоптозом. Однофакторный дисперсионный анализ, тест Фишера. \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* —  $p < 0,0001$

белка и запускаются защитные механизмы, направленные прежде всего на адаптацию к стрессу и восстановление белкового гомеостаза. Однако при сильном стрессе или его длительном сохранении баланс сдвигается в сторону активации проапоптотических сигнальных путей, что ведет к гибели клетки [28]. Мы показали, что ЭПР-стресс вызывает активацию PERK-пути, о чем говорит повышение уровня мРНК гена *Atf4*, однако эта активация менее выражена в NEAT1\_1Tg-культурах (рис. 5). В соответствии с этим в NEAT1\_1Tg-культурах также снижена активация проапоптотического гена *Ddit3* (*Chop*), который относится к тому же сигнальному пути PERK/ATF4/CHOP и является активатором перехода клетки к апоптозу при ЭПР-стрессе [29]. В обеих культурах при стрессе повышается экспрессия гена шаперона *Hspa5* (BiP), что также указывает на развертывание ЭПР-стресса. Быстрый ответ NEAT1\_1Tg-клеток на стресс и запуск апоптоза через активацию каспазы 3 мог бы быть объяснен изначальными различиями в количестве неактивной формы каспазы 3 в клетках. Анализ экспрессии каспазы 3 (*Casp3*) показал, что по крайней мере на начальном этапе развития стресса, через 4 ч после обработки клеток MG132, ее уровень одинаков во всех четырех группах. Учитывая повышение числа клеток, окрашивающихся антителами к активированной форме каспазы 3 уже через 4 ч после запуска стресса, можно сделать вывод о том, что различия в гибели между NEAT1\_1Tg- и WT-клетками обусловлены другими регулирующими факторами, в частности расщеплением прокаспазы 3 с образованием

ее активированной формы. Далее мы проанализировали экспрессию ряда генов ингибиторов апоптоза: *Bcl211*, *Bcl212*, *Mcl1* [30]. Экспрессия *Bcl211* не изменялась в ответ на ЭПР-стресс. Для генов *Bcl212* и *Mcl1* выявлено повышение их уровня в WT-культурах, тогда как в культурах NEAT1\_1Tg такая активация практически отсутствовала для *Bcl212* и была значительно менее выражена для *Mcl1*. Мы также обнаружили, что в NEAT1\_1Tg-культурах снижен уровень мРНК гена *Emc4*, который относится к семейству консервативных трансмембранных белков, необходимых для укладки белков в ЭПР. Недостаток белков Emc сам по себе способен приводить к развитию ЭПР-стресса [31]. Таким образом, повышенный уровень NEAT1\_1 в нейронных культурах при развитии ЭПР-стресса приводит к снижению регуляторных антиапоптотических сигналов, что усиливает клеточную гибель, в том числе и нейронов.

## Выводы

Дополнительная экспрессия трансгенной длинной некодирующей РНК NEAT1\_1 человека в условиях развития ЭПР-стресса способствует апоптотической гибели нервных клеток в первичных культурах гиппокампов. Повышение уровня данной РНК в нервной системе пациентов с нейродегенеративными заболеваниями (БАС, ФТД, ХГ), при которых происходят белковая агрегация и развитие ЭПР-стресса, может быть рассмотрено как патогенетический фактор.

## Литература

- Kopp F, Mendell JT. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*. 2018; 172 (3): 393–407.
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 2009; 10 (3): 155–9.
- Zimmer-Bensch G. Emerging Roles of Long Non-Coding RNAs as Drivers of Brain Evolution. *Cells*. 2019; 8 (11).
- Wan P, Su W, Zhuo Y. The Role of Long Noncoding RNAs in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2017; 54 (3): 2012–21.
- An H, Williams NG, Shelkovnikova TA. NEAT1 and paraspeckles in neurodegenerative diseases: A missing linc found? *Noncoding RNA Res*. 2018; 3 (4): 243–52.
- Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, et al. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci*. 2011; 14 (4): 452–8.
- Sunwoo JS, Lee S, Kim JH, Lim JA, Kim TJ, Byun JI, et al. Altered functional connectivity in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: a resting-state EEG study. *Sleep*. 2017; 40 (6).
- Cheng C, Spengler RM, Keiser MS, Monteys AM, Rieders JM, Ramachandran S, et al. The long non-coding RNA NEAT1 is elevated in polyglutamine repeat expansion diseases and protects from disease gene-dependent toxicities. *Hum Mol Genet*. 2018; 27 (24): 4303–14.
- An H, Tan JT, Shelkovnikova TA. Stress granules regulate stress-induced paraspeckle assembly. *J Cell Biol*. 2019; 218 (12): 4127–40.
- Kukharsky MS, Ninkina NN, An H, Telezhkin V, Wei W, Meritens CR, et al. Long non-coding RNA Neat1 regulates adaptive behavioural response to stress in mice. *Transl Psychiatry*. 2020; 10 (1): 171.
- Nishimoto Y, Nakagawa S, Hirose T, Okano HJ, Takao M, Shibata S, et al. The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1\_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Brain*. 2013; 6: 31.
- Shelkovnikova TA, Kukharsky MS, An H, Dimasi P, Alexeeva S, Shabir O, et al. Protective paraspeckle hyper-assembly downstream of TDP-43 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2018; 13 (1): 30.
- Matsukawa K, Kukharsky MS, Park SK, Park S, Watanabe N, Iwatsubo T, et al. Long non-coding RNA NEAT1\_1 ameliorates TDP-43 toxicity in in vivo models of TDP-43 proteinopathy. *RNA Biol*. 2021; 18 (11): 1546–54.
- Nakagawa S, Naganuma T, Shioi G, Hirose T. Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J Cell Biol*. 2011; 193 (1): 31–9.
- Wiseman RL, Mesgarzadeh JS, Hendershot LM. Reshaping endoplasmic reticulum quality control through the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2022; 82 (8): 1477–91.
- Kukharsky MS, Everett MW, Lytkina OA, Raspopova MA, Kovrazhkina EA, Ovchinnikov RK, et al. Protein homeostasis dysregulation in pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mol Biol (Mosk)*. 2022; 56 (6): 1044–56.
- Merighi A, Lossi L. Endoplasmic reticulum stress signaling and neuronal cell death. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (23).
- Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, Callaghan SM, Park DS, Cregan SP. Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J Neurosci*. 2010; 30 (50): 16938–48.
- Deikin AV, Kovrazhkina EA, Ovchinnikov RK, Bronovitskii EV, Razinskaia OD, Smirnov AP, et al. A mice model of amyotrophic lateral sclerosis expressing mutant human FUS protein. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2014; 114 (8): 62–9.
- Kukharsky MS, Quintiero A, Matsumoto T, Matsukawa K, An H, Hashimoto T, et al. Calcium-responsive transactivator (CREST) protein shares a set of structural and functional traits with other proteins associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2015; 10: 20.
- Bai L, You Q, Feng X, Kovach A, Li H. Structure of the ER membrane complex, a transmembrane-domain insertase. *Nature*. 2020; 584 (7821): 475–8.
- Mello SS, Sinow C, Raj N, Mazur PK, Biegging-Rolett K, Broz DK, et al. Neat1 is a p53-inducible lincRNA essential for transformation suppression. *Genes Dev*. 2017; 31 (11): 1095–108.
- Zhong J, Jiang L, Huang Z, Zhang H, Cheng C, Liu H, et al. The long non-coding RNA Neat1 is an important mediator of the therapeutic effect of bexarotene on traumatic brain injury in mice. *Brain Behav Immun*. 2017; 65: 183–94.
- Zhang Y, Luo M, Cui X, O'Connell D, Yang Y. Long noncoding RNA NEAT1 promotes ferroptosis by modulating the miR-362-3p/MIOX axis as a ceRNA. *Cell Death Differ*. 2022; 29 (9): 1850–63.
- Dong LI, Zheng Y, Gao L, Luo X. lncRNA NEAT1 prompts autophagy and apoptosis in MPTP-induced Parkinson's disease by impairing miR-374c-5p. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2021; 53 (7): 870–82.
- Liu Y, Lu Z. Long non-coding RNA NEAT1 mediates the toxic of Parkinson's disease induced by MPTP/MPP+ via regulation of gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018; 45 (8): 841–8.
- Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, et al. NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Mol Biol Cell*. 2014; 25 (1): 169–83.
- Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, et al. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol*. 2006; 4 (11): e374.
- Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Front Immunol*. 2018; 9: 3083.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*. 2010; 37 (3): 299–310.
- Tian S, Wu Q, Zhou B, Choi MY, Ding B, Yang W, et al. Proteomic analysis identifies membrane proteins dependent on the ER membrane protein complex. *Cell Rep*. 2019; 28 (10): 2517–26 e5.

## References

- Kopp F, Mendell JT. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*. 2018; 172 (3): 393–407.
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 2009; 10 (3): 155–9.
- Zimmer-Bensch G. Emerging Roles of Long Non-Coding RNAs as Drivers of Brain Evolution. *Cells*. 2019; 8 (11).
- Wan P, Su W, Zhuo Y. The Role of Long Noncoding RNAs in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2017; 54 (3): 2012–21.
- An H, Williams NG, Shelkovnikova TA. NEAT1 and paraspeckles in neurodegenerative diseases: A missing linc found? *Noncoding RNA Res*. 2018; 3 (4): 243–52.
- Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, et al. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci*. 2011; 14 (4): 452–8.
- Sunwoo JS, Lee S, Kim JH, Lim JA, Kim TJ, Byun JI, et al. Altered functional connectivity in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: a resting-state EEG study. *Sleep*. 2017; 40 (6).
- Cheng C, Spengler RM, Keiser MS, Monteys AM, Rieders JM, Ramachandran S, et al. The long non-coding RNA NEAT1 is elevated in polyglutamine repeat expansion diseases and protects from disease gene-dependent toxicities. *Hum Mol Genet*. 2018; 27 (24): 4303–14.
- An H, Tan JT, Shelkovnikova TA. Stress granules regulate stress-induced paraspeckle assembly. *J Cell Biol*. 2019; 218 (12): 4127–40.
- Kukharsky MS, Ninkina NN, An H, Telezhkin V, Wei W, Meritens CR, et al. Long non-coding RNA Neat1 regulates adaptive behavioural response to stress in mice. *Transl Psychiatry*. 2020; 10 (1): 171.
- Nishimoto Y, Nakagawa S, Hirose T, Okano HJ, Takao M, Shibata S, et al. The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1\_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the

- early phase of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Brain*. 2013; 6: 31.
12. Shelkova TA, Kukharsky MS, An H, Dimasi P, Alexeeva S, Shabir O, et al. Protective paraspeckle hyper-assembly downstream of TDP-43 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2018; 13 (1): 30.
  13. Matsukawa K, Kukharsky MS, Park SK, Park S, Watanabe N, Iwatsubo T, et al. Long non-coding RNA NEAT1\_1 ameliorates TDP-43 toxicity in in vivo models of TDP-43 proteinopathy. *RNA Biol*. 2021; 18 (11): 1546–54.
  14. Nakagawa S, Naganuma T, Shioi G, Hirose T. Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J Cell Biol*. 2011; 193 (1): 31–9.
  15. Wiseman RL, Mesgarzadeh JS, Hendershot LM. Reshaping endoplasmic reticulum quality control through the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2022; 82 (8): 1477–91.
  16. Kukharsky MS, Everett MW, Lytkina OA, Raspopova MA, Kovrazhkina EA, Ovchinnikov RK, et al. Protein homeostasis dysregulation in pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mol Biol (Mosk)*. 2022; 56 (6): 1044–56.
  17. Merighi A, Lossi L. Endoplasmic reticulum stress signaling and neuronal cell death. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (23).
  18. Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, Callaghan SM, Park DS, Cregan SP. Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J Neurosci*. 2010; 30 (50): 16938–48.
  19. Deikin AV, Kovrazhkina EA, Ovchinnikov RK, Bronovitskii EV, Razinskaia OD, Smirnov AP, et al. A mice model of amyotrophic lateral sclerosis expressing mutant human FUS protein. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2014; 114 (8): 62–9.
  20. Kukharsky MS, Quintiero A, Matsumoto T, Matsukawa K, An H, Hashimoto T, et al. Calcium-responsive transactivator (CREST) protein shares a set of structural and functional traits with other proteins associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2015; 10: 20.
  21. Bai L, You Q, Feng X, Kovach A, Li H. Structure of the ER membrane complex, a transmembrane-domain insertase. *Nature*. 2020; 584 (7821): 475–8.
  22. Mello SS, Sinow C, Raj N, Mazur PK, Biegging-Rolett K, Broz DK, et al. Neat1 is a p53-inducible lincRNA essential for transformation suppression. *Genes Dev*. 2017; 31 (11): 1095–108.
  23. Zhong J, Jiang L, Huang Z, Zhang H, Cheng C, Liu H, et al. The long non-coding RNA Neat1 is an important mediator of the therapeutic effect of bexarotene on traumatic brain injury in mice. *Brain Behav Immun*. 2017; 65: 183–94.
  24. Zhang Y, Luo M, Cui X, O'Connell D, Yang Y. Long noncoding RNA NEAT1 promotes ferroptosis by modulating the miR-362-3p/MIOX axis as a ceRNA. *Cell Death Differ*. 2022; 29 (9): 1850–63.
  25. Dong LI, Zheng Y, Gao L, Luo X. lncRNA NEAT1 prompts autophagy and apoptosis in MPTP-induced Parkinson's disease by impairing miR-374c-5p. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2021; 53 (7): 870–82.
  26. Liu Y, Lu Z. Long non-coding RNA NEAT1 mediates the toxic of Parkinson's disease induced by MPTP/MPP+ via regulation of gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018; 45 (8): 841–8.
  27. Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, et al. NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Mol Biol Cell*. 2014; 25 (1): 169–83.
  28. Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, et al. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol*. 2006; 4 (11): e374.
  29. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Front Immunol*. 2018; 9: 3083.
  30. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*. 2010; 37 (3): 299–310.
  31. Tian S, Wu Q, Zhou B, Choi MY, Ding B, Yang W, et al. Proteomic analysis identifies membrane proteins dependent on the ER membrane protein complex. *Cell Rep*. 2019; 28 (10): 2517–26 e5.

## ЧАСТОТНО-ЗАВИСИМЫЙ ЭФФЕКТ ТРАНСКРАНИАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ ТЕТА-ВСПЫШКАМИ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ

Н. А. Супонева, И. С. Бакулин, А. Г. Пойдашева <sup>✉</sup>, Д. О. Сеницын, А. Х. Забирова, Д. Ю. Лагода, М. А. Пирадов

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Стимуляция тета-вспышками (TBS) находит широкое применение благодаря индукции долговременных эффектов при короткой длительности протокола. Для уменьшения вариабельности эффекта исследуют подходы к ее персонализации, например, по частотам тета-гамма сопряжения (ТГС). Целью исследования было разработать протокол персонализированной по ТГС навигационной стимуляции интермиттирующими тета-вспышками (iTBS-ind) и сравнить его со стандартным (iTBS-5/50) и имитацией стимуляции (iTBS-sham). В исследование включены 16 здоровых добровольцев (M — 7; 29,6 лет), которым в случайном порядке проводили по одной сессии каждого протокола iTBS левой дорсолатеральной префронтальной коры. Эффект оценивали с помощью тестов *n*-back с одновременным предъявлением вербальных и пространственных стимулов ( $n = 2,3$ ), Digit span, Corsi blocks, Tower of London; тестирование проводили до, сразу и через 60 мин после стимуляции. Серьезных нежелательных явлений не зарегистрировали. Статистически значимый эффект получен при оценке через 60 мин для iTBS-5/50 на тест *n*-back с пространственными стимулами ( $n = 3$ ) ( $p_{\text{corr}} = 0,018$ ), для всех протоколов — на тест Tower of London ( $p_{\text{corr}} = 0,039$  для iTBS-5/50,  $p_{\text{corr}} = 0,045$  для iTBS-ind и  $p_{\text{corr}} = 0,003$  для iTBS-sham). Эффект iTBS-5/50 был статистически значимо выше по сравнению с iTBS-sham в отношении пространственного теста *n*-back ( $n = 3$ ) ( $p_{\text{corr}} = 0,039$ ), но ниже по сравнению с iTBS-ind и iTBS-sham в отношении теста Corsi blocks ( $p_{\text{corr}} = 0,038$  и  $0,048$  соответственно). Таким образом, не удалось подтвердить эффективность и преимущества персонализированного протокола по сравнению со стандартным и имитацией стимуляции. В связи с полученным эффектом стандартного протокола может быть перспективным дальнейшее его изучение.

**Ключевые слова:** транскраниальная магнитная стимуляция, стимуляция тета-вспышками, неинвазивная нейромодуляция, фазово-амплитудное сопряжение, тета-гамма сопряжение, левая дорсолатеральная префронтальная кора, когнитивные функции, intermittent theta-burst stimulation

**Финансирование:** исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00078, <https://www.rscf.ru/project/22-25-00078/>

**Вклад авторов:** Н. А. Супонева, И. С. Бакулин, А. Г. Пойдашева, М. А. Пирадов — концептуализация исследования; Н. А. Супонева, И. С. Бакулин, А. Г. Пойдашева, Д. О. Сеницын, М. А. Пирадов — планирование и дизайн исследования; И. С. Бакулин, А. Г. Пойдашева, А. Х. Забирова, Д. Ю. Лагода — проведение исследования и сбор данных; И. С. Бакулин, А. Г. Пойдашева, Д. О. Сеницын, А. Х. Забирова — анализ данных; все авторы — интерпретация данных; Н. А. Супонева, И. С. Бакулин, А. Г. Пойдашева — подготовка черновика рукописи; все авторы — редактирование рукописи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр неврологии» (протокол 3-7/22 от 20 апреля 2022 г.). Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации; все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Александра Георгиевна Пойдашева  
Волоколамское шоссе, д. 80, г. Москва, 125310, Россия; [poydasheva@neurology.ru](mailto:poydasheva@neurology.ru)

**Статья получена:** 07.10.2023 **Статья принята к печати:** 13.11.2023 **Опубликована онлайн:** 07.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.045

## PREFRONTAL CORTEX TRANSCRANIAL THETA-BURST STIMULATION FREQUENCY-DEPENDENT EFFECTS ON COGNITIVE FUNCTIONS

Suponeva NA, Bakulin IS, Poydasheva AG <sup>✉</sup>, Sinityn DO, Zabirova AH, Lagoda DYU, Piradov MA

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Theta-burst stimulation (TBS) is widely used due to induction of the long-lasting effects with short protocol duration. To reduce the variability of the effect, approaches to personalize it, such as using theta-gamma coupling frequencies (TGC), are being investigated. The study was aimed to develop the personalized protocol of navigated intermittent theta-burst stimulation (iTBS-ind) based on TGC, and to compare this protocol with the standard one (iTBS-5/50) and sham stimulation (iTBS-sham). The study involved 16 healthy volunteers (M — 7; 29.6 years), who were randomized to receive one session of each protocol of the left dorsolateral prefrontal cortex iTBS. The effects were estimated using the *n*-back test with simultaneous presentation of verbal and spatial stimuli ( $n = 2, 3$ ), Digit Span test, Corsi blocks task, Tower of London test; testing was performed immediately before, immediately after and 60 min after stimulation. No severe adverse events were reported. Significant effect was obtained when performing assessment after 60 min for iTBS-5/50 in the *n*-back test with spatial stimuli ( $n = 3$ ) ( $p_{\text{corr}} = 0.018$ ), for all protocols in the Tower of London test ( $p_{\text{corr}} = 0.039$  for iTBS-5/50,  $p_{\text{corr}} = 0.045$  for iTBS-ind,  $p_{\text{corr}} = 0.003$  for iTBS-sham). The iTBS-5/50 effect was significantly higher compared to iTBS-sham in the spatial *n*-back test ( $n = 3$ ) ( $p_{\text{corr}} = 0.039$ ), but lower compared to iTBS-ind and iTBS-sham in the Corsi blocks task ( $p_{\text{corr}} = 0.038$  and  $0.048$ , respectively). Thus, we failed to confirm the personalized protocol efficacy and superiority to the standard protocol and sham stimulation. Considering the effect of standard protocol, its further investigation can be promising.

**Keywords:** transcranial magnetic stimulation, non-invasive neuromodulation, phase-amplitude coupling, theta-gamma coupling, left dorsolateral prefrontal cortex, cognitive functions, intermittent theta-burst stimulation

**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation (RSF), grant № 22-25-00078, <https://www.rscf.ru/project/22-25-00078/>

**Author contribution:** Suponeva NA, Bakulin IS, Poydasheva AG, Piradov MA — study concept; Suponeva NA, Bakulin IS, Poydasheva AG, Sinityn DO, Piradov MA — study planning and design; Bakulin IS, Poydasheva AG, Zabirova AH, Lagoda DYU — research procedure and data acquisition; Bakulin IS, Poydasheva AG, Sinityn DO, Zabirova AH — data analysis; all authors — data interpretation; Suponeva NA, Bakulin IS, Poydasheva AG — manuscript draft writing; all authors — manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (protocol 3-7/22 dated 20 April 2022), it was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki; the informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexandra G. Poydasheva  
Volokolamskoye shosse, 80, Moscow, 125310, Russia; [poydasheva@neurology.ru](mailto:poydasheva@neurology.ru)

**Received:** 07.10.2023 **Accepted:** 13.11.2023 **Published online:** 07.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.045

Неинвазивная нейромодуляция, в частности, транскраниальная магнитная стимуляция (ТМС), используется как при изучении когнитивных функций, так и в качестве потенциального метода их улучшения у здоровых лиц и пациентов [1–3].

Считается, что эффект ритмической ТМС обусловлен влиянием на механизмы нейропластичности [4, 5]. Он не ограничивается стимулируемым участком, распространяясь на функционально связанные с ним компоненты нейронных сетей [1]. В последние годы все больше внимания уделяют изучению “паттерновых” протоколов ТМС, включая стимуляцию тета-вспышками (theta-burst stimulation, TBS), когда «вспышки» из трех стимулов с заданной частотой (обычно 30 или 50 Гц) подаются с частотой 3 или 5 Гц. Вспышки могут предъявляться постоянно по 20 или 40 с (continuous TBS, cTBS) или по 2 с с перерывом 8 с (стимуляция интермиттирующими тета-вспышками — intermittent TBS, iTBS) [6–7]. Для TBS характерна достаточно высокая продолжительность нейромодулирующего эффекта при небольшой длительности стимуляции, что делает перспективным применение в клинической практике [8].

Данные относительно эффекта TBS на когнитивные функции у здоровых добровольцев остаются противоречивыми [9]. Одной из причин может быть высокая межиндивидуальная вариабельность ответа на стимуляцию, снижающая групповой эффект. Кроме того, эффекты плохо воспроизводятся на индивидуальном уровне: улучшение когнитивных функций у здоровых добровольцев в ответ на сессию стимуляции тета-вспышками наблюдается в 70% случаев, однако воссоздается при повторной оценке в другой день лишь у 37,5% [10].

Один из подходов к уменьшению вариабельности — разработка персонализированных протоколов, в частности, по частоте стимуляции. Помимо подбора по индивидуальным частотам корковых ритмов [11, 12], относительно новым стал выбор на основе фазово-амплитудного сопряжения (ФАС) корковых осцилляций.

Наиболее изученный вариант ФАС — тета-гамма сопряжение (ТГС), которое имеет важное значение для процессов памяти. При этом амплитуда осцилляций в гамма-диапазоне (более 30 Гц) модулируется фазой колебаний в тета-диапазоне (4–8 Гц) [13–15]. Показана корреляция ТГС с результатами тестов на рабочую память (РП) и некоторые другие когнитивные функции у здоровых добровольцев [16], а его снижение наблюдают при болезни Альцгеймера, умеренных когнитивных нарушениях и психиатрических заболеваниях [13, 17].

Доступны результаты единичных исследований с использованием протоколов неинвазивной нейромодуляции, персонализированных по частоте ТГС. Обнаружен статистически значимо более высокий эффект одной сессии персонализированного протокола на показатель теста *n*-back у здоровых добровольцев по сравнению со стандартной iTBS (6/30 и 5/50 Гц) при оценке через 45 мин после стимуляции и выявлены статистически значимые различия между показателями ТМС-вызванных ЭГ-потенциалов между стандартным и персонализированным протоколами [18]. Учитывая эти данные, целью исследования стала оценка эффекта персонализированного по ТГС протокола стимуляции левой дорсолатеральной префронтальной коры (лДЛПФК) на показатели когнитивного тестирования у здоровых добровольцев, а также сравнение его эффективности со стандартным протоколом и имитацией стимуляции.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Перед включением в исследование участники заполняли опросник для выявления противопоказаний для проведения ТМС, а также модифицированную версию Эдинбургского опросника (Edinburgh Handedness Inventory, EHI) [19]. Был проведен сбор анамнеза и демографических данных, рутинная ЭЭГ со стандартными функциональными пробами для исключения эпилептиформной активности (Нейрон-Спектр 4/П, ООО «Нейрософт»; Россия). Критерии включения: добровольное информированное согласие, возраст 18–40 лет, коэффициент латерализации > 40 по EHI. Критерии невключения: наличие противопоказаний к МРТ/ТМС, выявление эпилептиформной активности при рутинной ЭЭГ, неврологические или психические заболевания в анамнезе, прием препаратов, влияющих на ЦНС, наличие декомпенсированных хронических соматических заболеваний. Критерии исключения: тяжелые нежелательные явления (НЯ) при проведении ТМС (ТМС-индуцированный эпилептический приступ, синкопа и др.), развитие соматических, неврологических, психических заболеваний, наступление беременности, отказ от участия.

### Определение индивидуальных частот тета-гамма сопряжения

Для определения частот ТГС проводили регистрацию 64-канальной ЭЭГ (система 10–10), синхронизированной с тестом *n*-back (предъявлялись согласные буквы латинского алфавита с  $n = 3$ , подробное описание методики дано ниже). Для регистрации ЭЭГ использовали систему actiCHamp Plus 64 (BP-100-2511) (Brain Products GmbH; Германия), для синхронизации — систему Trigger Station (Brain Trends; Италия), парадигма была написана в ПО E-Prime 3.0 software (Psychology Software Tools; США). Предъявляли 3 серии по 24 стимула (6 совпадающих в каждой серии), демонстрируемых с интервалом 3000 мс, время предъявления стимула — 250 мс. Между сериями были перерывы для отдыха, длительность добровольцев определял самостоятельно (10–20 с). Перед основным тестом проводили тренировку с  $n = 1$  и 2.

Предобработку и анализ ЭЭГ проводили в ПО EEGLAB и MATLAB (The MathWorks, Inc.; США). Предобработка включала удаление каналов с высоким уровнем шума, приведение к среднему референсу, фильтрацию в полосе от 1 до 80 Гц с полосно-заграждающим фильтром в диапазоне 49–51 Гц, удаление временных интервалов с артефактным сигналом и удаление артефактов с помощью метода независимых компонент. Для расчета фазы и амплитуды ТГС анализировали сигналы от электродов Fz и Pz соответственно [18]. В качестве референта использовали усредненный сигнал от всех регистрирующих электродов. Анализировали интервалы от 250 мс после окончания показа стимула до момента показа следующего с обрезкой по 750 мс с каждой стороны для уменьшения краевых артефактов (69 интервалов по 1000 мс). Для выделения ритмов проводили вейвлетное преобразование с числами циклов для фазы и амплитуды, равными 6 и 4. Силу сопряжения оценивали с помощью индекса длины среднего вектора (mean vector length, MVL) как наиболее чувствительного в предположении монофазного сопряжения. Для устранения неравномерности распределения фаз и больших флуктуаций амплитуд использовали процедуру нормализации индекса. Для

каждого испытуемого были построены комодулограммы ТГС. Частоты максимального ТГС были использованы для разработки персонализированного протокола iTBS.

### Протоколы стимуляции тета-вспышками

TMS выполняли с помощью стимулятора MagPro X100 + MagOption (Tonika Elektronik A/S; Дания) с навигационной системой Localite TMS Navigator (Localite GmbH; Германия) и роботизированным манипулятором Axilum Robotics TMS-Cobot (Axilum Robotics; Франция) с помощью восьмеркообразной катушки с жидкостным охлаждением. Для навигационной TMS проводили MPT в режиме 3D-T1-MPR (3D T1 multiplanar reconstruction) на приборах MAGNETOM Verio и MAGNETOM Prisma (Siemens Healthcare GmbH; Германия) (размер вокселя —  $1.0 \times 0.977 \times 0.977$  мм<sup>3</sup>, 176 сагиттальных срезов). Мишень в пределах лДЛПФК определяли как точку на 5 см спереди от «горячей точки» (hot spot) коркового представительства первой дорзальной межкостной мышцы (FDI, first dorsal interosseus), локализацию уточняли с учетом индивидуальных данных структурной MPT. Для электромиографической регистрации вызванных моторных ответов задействовали Ag/Cl электроды (ООО «Нейрософт»; Россия), накладываемые на область брюшка (активный электрод) и сухожилия (референсный электрод). В протоколах активной стимуляции использовали интенсивность, равную 75% от индивидуального моторного порога покоя, определенного в соответствии с алгоритмом Rossini-Rothwell для FDI перед каждой сессией.

В ходе перекрестного исследования каждому испытуемому проводили по одной сессии стимуляции в соответствии с приведенными ниже протоколами с интервалом не менее 72 часов между ними. Все сессии проводили в одном и том же временном промежутке (8–14 или 14–17 ч). Протоколы были псевдорандомизированы с помощью метода латинских квадратов и включали:

- iTBS-5/50 — стандартный протокол iTBS (вспышки из 3 стимулов с частотой 50 Гц, частота вспышек — 5 Гц). Один блок состоял из 10 вспышек, интервал между блоками составлял 8 с, общее количество стимулов за сессию — 600;

- iTBS-ind — персонализированный протокол iTBS (вспышки из 3 стимулов, частота стимулов соответствовала частоте гамма-ритма, а частота вспышек — частоте тета-ритма при максимальном ТГС, определенном на предыдущем этапе). Один блок состоял из 10 вспышек, интервал между блоками составлял 8 с, общее количество стимулов за сессию было максимально приближено к 600 для данного соотношения частот;

- iTBS-sham — имитация стимуляции (sham-стимуляция) с использованием специального восьмеркообразного койла, имитирующего звук предъявляемых стимулов, но не индуцирующего сами стимулы, и локальной низкоинтенсивной электрической стимуляции, имитирующей сенсорные ощущения магнитной стимуляции. Длительность и частоты звуковой имитации стимулов были аналогичны стандартному, интенсивность электрической стимуляции определяли индивидуально в зависимости от выраженности ощущений в области стимуляции.

### Когнитивное тестирование

Нейропсихологическое тестирование проводили с помощью ПО PEVL v 2.0 (Psychology Experiment Building

Language) [20]. Для минимизации отвлекающих факторов участники надевали шумоизолирующие наушники. Использованы следующие тесты: n-back с одновременным предъявлением пространственных и вербальных стимулов, Corsi blocks с обратным воспроизведением, Digit span с прямым воспроизведением и «Башня Лондона» (Tower of London).

В тесте n-back испытуемым одновременно предъявляли пространственные (положение квадратов) и вербальные (согласные буквы латинского алфавита) стимулы [21]. Задача испытуемого состояла в определении совпадения текущего стимула со стимулом, предъявленным  $n$  шагов назад, и нажатии на клавишу при выявлении совпадения. Точность выполнения оценивали с помощью индекса чувствительности  $d'$  [22]. Для его расчета использованы количество правильных нажатий клавиши в ответ на совпадающий стимул (hits) и ложных нажатий в ответ на несовпадающий (false alarms). Количество правильных нажатий нормировали на общее количество совпадающих стимулов (6 для использованной версии задачи), а количество ложных нажатий — на общее количество несовпадающих стимулов (16 и 17 для n-back с  $n = 2$  и  $n = 3$ , соответственно). Для каждого из нормированных показателей проводили Z-преобразование, а  $d'$  рассчитывали как разность Z-показателей для правильных и ложных нажатий. Учитывая одновременное предъявление вербальных и пространственных стимулов, дополнительно определяли суммарный показатель  $d'$  для двух типов стимулов с каждым  $n$ . Анализировали результаты при  $n = 2$  и  $n = 3$ . Перед каждым тестом n-back проводили тренировку с отдельным предъявлением вербальных стимулов с  $n = 1$  и 2, пространственных стимулов с  $n = 1$  и сочетанием двух видов стимулов с  $n = 1$ .

В тесте Corsi blocks необходимо запомнить порядок предъявления квадратов и воспроизвести его в обратном порядке. Оценивали максимальную длину безошибочно воспроизведенной последовательности.

В тесте Digit span испытуемому предъявляли цифровой ряд, который он должен был воспроизвести в прямом порядке, начиная с последовательности длиной в 5 цифр, с шагом в 1 цифру, и заканчивая максимальной длиной в 10 цифр. Оценивали максимальную длину числовой последовательности, которую испытуемый может повторить без ошибок, либо после достижения максимальной длины в 10 цифр — общее количество правильно воспроизведенных последовательностей.

В тесте Tower of London испытуемому предлагали с помощью перемещения цветных дисков воспроизвести заданную их последовательность. При этом фиксировали время выполнения задания.

Значения показателей тестов измеряли в трех временных точках: T0 — до начала стимуляции, T1 — непосредственно после ее окончания и T2 — через 1 ч после окончания стимуляции. Эффект стимуляции в точках T1 и T2 оценивали как разность показателей в каждой из этих точек с начальным значением в T0.

### Статистическая обработка данных

Статистический анализ выполняли с помощью пакета IBM SPSS Statistics (v.23) (IBM, SPSS Inc.; США). Оценку эффекта каждого протокола в T1 и T2 по сравнению с T0, а также сравнение эффектов между разными протоколами проводили с помощью критерия Фридмана. При выявлении статистически значимых различий для

Таблица 1. Индивидуальные частоты тета-гамма сопряжения

N	Частоты тета-гамма сопряжения		Протокол стимуляции		
	Индивидуальная тета-частота, Гц	Индивидуальная гамма-частота, Гц	Частота вспышек, Гц	Частота стимулов внутри вспышки, Гц	Общее число стимулов
1	7,6	42	8	41,7	624
2	8	44	8	43,5	624
3	7	48	7	47,6	588
4	6	56	6	56	600
5	7	30	7	30	588
6	7	32	7	32,3	588
7	7	50	7	50	588
8	5	44	5	44	600
9	8	30	8	30	624
10	4	60	4	59,9	600
11	4	30	4	30	600
12	4	32	4	32	600
13	5	38	5	38	600
14	5	30	5	30	600
15	6	42	6	42	600
16	6	34	6	34	600

попарных сравнений использован критерий Уилкоксона с поправкой Бонферрони. Порог статистической значимости был установлен на уровне  $p = 0,05$ .

#### Оценка безопасности и переносимости протоколов стимуляции

Все участники заполняли стандартизированные опросники для оценки НЯ во время сессии ТМС сразу после проведения стимуляции, и в течение 24 ч после стимуляции — перед каждой последующей сессией стимуляции.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Скрининг прошли 25 человек, из них 4 имели противопоказания к проведению ТМС (прием препаратов, влияющих на ЦНС, — 3, соматическая патология — 1). Среди включенных добровольцев 5 не смогли завершить

участие в исследовании (4 — по логистическим причинам, 1 — из-за плохой переносимости ТМС). В финальный анализ были включены данные 16 добровольцев (7 мужчин, средний возраст — 29,6 лет).

#### Индивидуальные частоты тета-гамма сопряжения

По результатам анализа данных ЭЭГ с парадигмой были получены следующие частоты ТГС, использованные для индивидуальных протоколов (табл. 1). Пример индивидуальной комодулограммы представлен на рис.

#### Безопасность и переносимость

Проанализированы данные 50 сессий (16 — iTBS-ind и по 17 — iTBS-5/50 и iTBS-sham). Серьезных НЯ зарегистрировано не было. Один доброволец отказался от продолжения участия после 2-й сессии стимуляции

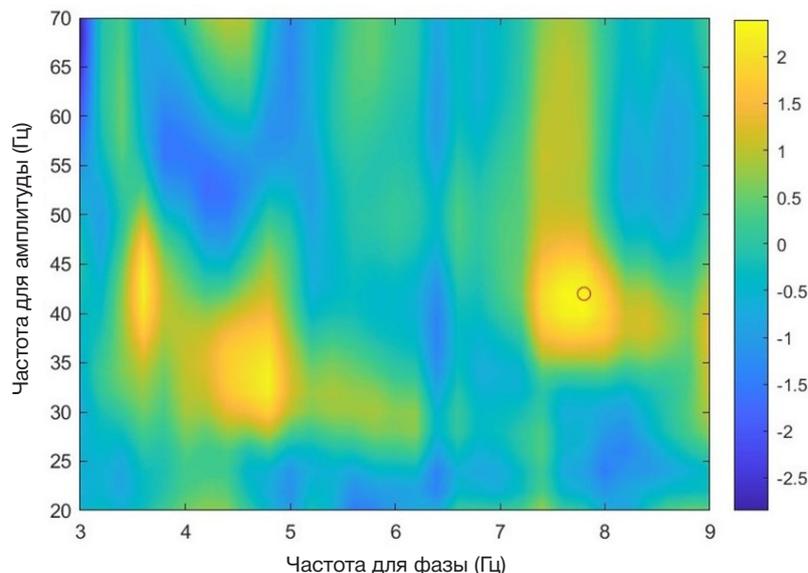


Рис. Индивидуальная комодулограмма здорового добровольца. Цветовой шкалой обозначены значения нормализованного индекса модуляции MVL (mean vector length); максимум тета-гамма сопряжения обозначен красным кружочком (частоты 7,6; 40 Гц)

Таблица 2. Нежелательные явления во время и в течение 24 ч после стимуляции

Протокол	iTBS-5/50	iTBS-ind	iTBS-sham
Всего сессий	17	16	17
НЯ во время стимуляции			
Сессии с НЯ	7	8	14
Случаи головной боли во время стимуляции	2	2	8
Неболевые неприятные ощущения	4	5	3
Сонливость	2	1	2
Трудности концентрации внимания	1	0	1
НЯ в течение 24 ч после стимуляции			
Всего сессий	4	1	1
Головная боль в течение 24 ч после стимуляции	3	1	1
Другие неприятные ощущения в течение 24 ч после стимуляции	4	0	1

**Примечание:** iTBS-5/50 — стандартный протокол стимуляции тета-вспышками, iTBS-ind — персонализированный протокол стимуляции тета-вспышками, iTBS-sham — имитация стимуляции

(iTBS-5/50) из-за развития НЯ в виде легкой головной боли (3 балла по числовой шкале боли, ЧШБ) и трудностей концентрации внимания.

В 29 сессиях (78%) были зарегистрированы легкие НЯ (табл. 2). Наиболее частым НЯ во время ТМС была слабая или умеренная боль в области стимуляции (12 сессий, 24%; 2–5 баллов по ЧШБ). Более выраженную боль (7–8 баллов по ЧШБ) наблюдали в одном случае во время стимуляции протоколом iTBS-ind и в одном случае — во время iTBS-sham. Головная боль в течение 24 часов после стимуляции также имела низкую интенсивность (2–3 балла по ЧШБ).

## Когнитивные эффекты

### Анализ эффекта отдельных протоколов

При анализе эффекта отдельных протоколов с помощью критерия Фридмана (оценка различий в трех временных

точках) статистически значимые изменения были обнаружены после протокола iTBS-5/50 для тестов n-back с пространственными стимулами ( $n = 3$ ) ( $p = 0,013$ ), Corsi blocks ( $p = 0,044$ ) и Tower of London ( $p = 0,015$ ), а также после iTBS-ind и iTBS-sham для теста Tower of London ( $p = 0,02$  и  $p = 0,006$  соответственно).

При попарных сравнениях с помощью критерия Уилкоксона статистически значимые различия показаны для протокола iTBS-5/50 в тесте n-back с пространственными стимулами ( $n = 3$ ) между измерениями в точках T2 и T0 ( $p_{\text{corr}} = 0,018$ , поправка Бонферрони на множественные сравнения), а также для теста Tower of London между измерениями в T2 и T1 ( $p_{\text{corr}} = 0,039$ ), сравнения для остальных тестов оказались статистически незначимыми. Для протоколов iTBS-ind и iTBS-sham статистически значимые различия получены для теста Tower of London в точках T2 и T0 ( $p_{\text{corr}} = 0,045$  и  $p_{\text{corr}} = 0,003$  соответственно) (табл. 3).

Таблица 3. Эффекты отдельных протоколов на показатели когнитивного тестирования

Название теста		iTBS-5/50			iTBS-ind			iTBS-sham			
	n	Тип стимула	T1-T0	T2-T0	T2-T1	T1-T0	T2-T0	T2-T1	T1-T0	T2-T0	T2-T1
n-back	n = 2	L	-0,32 [-0,42; 0,42]	-0,04 [-0,75; 0,74]	-0,12 [-0,55; 0,35]	0,04 [-0,37; 0,45]	0,04 [-0,39; 0,44]	0,00 [-0,02; 0,71]	-0,07 [-0,76; 0,58]	0,19 [-0,23; 0,69]	0,10 [-0,32; 1,00]
		S	-0,10 [-0,35; 0,65]	0,05 [-0,08; 0,86]	0,27 [-0,33; 0,83]	0,00 [-0,29; 0,35]	0,00 [-0,29; 0,39]	0,07 [-0,42; 0,42]	-0,42 [-0,54; 0,49]	-0,26 [-1,09; 0,56]	0,05 [-1,12; 0,81]
		Сумма	0,02 [-0,60; 0,86]	0,67 [-0,70; 0,84]	0,57 [-0,68; 0,78]	0,22 [-0,56; 0,52]	0,26 [-0,56; 0,95]	0,24 [-0,36; 0,71]	-0,02 [-0,99; 0,39]	0,40 [-1,29; 0,97]	0,32 [-0,31; 1,17]
	n = 3	L	-0,13 [-0,61; 0,55]	-0,24 [-0,54; 0,13]	-0,23 [-0,68; 0,71]	0,03 [-0,50; 0,70]	0,19 [-0,26; 0,64]	-0,10 [-0,49; 0,58]	-0,11 [-0,77; 0,59]	-0,32 [-0,56; 0,70]	-0,06 [-0,88; 0,65]
		S	0,32 [-0,09; 0,89]	<b>0,89</b> [0,00; 1,18]	0,40 [0,16; 0,74]	-0,05 [-0,61; 0,73]	0,16 [-0,70; 1,09]	0,12 [-0,35; 1,02]	0,06 [-0,35; 0,58]	-0,07 [-0,42; 0,05]	-0,16 [-0,39; 0,15]
		Сумма	0,29 [-0,60; 0,62]	0,62 [-0,58; 1,23]	0,50 [-0,93; 0,99]	-0,45 [-0,76; 0,50]	0,36 [-0,25; 1,41]	0,11 [-0,80; 1,24]	0,09 [-0,54; 0,49]	-0,05 [-0,96; 0,47]	-0,25 [-0,70; 0,74]
Digit span		0,00 [-1,00; 1,25]	1,00 [-0,25; 2,00]	1,00 [0,00; 1,00]	0,00 [-0,25; 1,00]	0,00 [-1,00; 1,00]	-0,50 [-1,00; 1,00]	-0,50 [-1,25; 1,00]	0,00 [-1,25; 0,25]	0,00 [-1,00; 0,25]	
Corsi blocks		0,00 [0,00; 1,00]	0,00 [-1,25; 0,00]	0,00 [-2,00; 0,00]	0,00 [-0,25; 1,25]	0,00 [0,00; 1,25]	0,00 [0,00; 0,25]	0,00 [0,00; 1,25]	0,00 [0,00; 2,00]	0,00 [0,00; 0,00]	
Tower of London		-4,00 [-51,8; 17,25]	-23,50 [-43,8; -4,25]	<b>-19,00</b> [-38,5; -3,25]	-26,00 [-48,3; 15,0]	<b>-36,00</b> [-68,0; -4,25]	-19,00 [-35,3; 1,5]	-10,00 [-49,8; 9,25]	<b>-32,00</b> [-54,5; -14,50]	-15,50 [-36,8; 3,5]	

**Примечание:** iTBS-5/50 — стандартный протокол стимуляции тета-вспышками, iTBS-ind — персонализированный протокол iTBS, iTBS-sham — имитация стимуляции; T1-T0 — разность показателей при измерении непосредственно после и до стимуляции (здесь и далее данные представлены в виде M [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]), T2-T0 — разность показателей при измерении через 60 мин после завершения стимуляции и до стимуляции; L — вербальные стимулы, S — пространственные стимулы, Сумма — сумма показателей  $d'$  для вербальных и пространственных стимулов с одинаковым n; Digit span — тест запоминания последовательности цифр, Corsi blocks — тест запоминания пространственной последовательности; Tower of London — тест Башня Лондона; статистически значимые различия ( $p < 0,05$  при попарном сравнении с помощью критерия Уилкоксона с поправкой Бонферрони) выделены полужирным шрифтом; для всех тестов, кроме Башни Лондона, положительное значение разности соответствует улучшению выполнения

Таблица 4. Сравнение эффекта между протоколами

Название теста		Тип стимула	pT1-T0	pT2-T0	pT2-T1
	n				
n-back	n = 2	L	0,57	0,779	0,56
		S	0,459	0,083	0,646
		Сумма	0,185	0,57	0,717
	n = 3	L	0,533	0,21	1
		S	0,276	0,236	0,028
		Сумма	0,57	0,21	0,829
Digit span			0,789	0,319	0,16
Corsi blocks			0,872	0,04	0,006
Tower of London			0,779	0,668	0,35

**Примечание:** pT1-T0 — уровень значимости разностей показателей в точках T1 и T0, pT2-T0 и pT2-T1 — аналогично для T2 и T0, T2 и T1 соответственно; L — вербальные стимулы, S — пространственные стимулы, Сумма — сумма показателей  $d'$  для вербальных и пространственных стимулов с одинаковым  $n$ ; Digit span — тест запоминания последовательности цифр, Corsi blocks — тест запоминания пространственной последовательности; Tower of London — тест Башня Лондона; статистически значимые различия обозначены полужирным шрифтом ( $p < 0,05$  при сравнении с помощью критерия Фридмана)

#### Сравнение эффекта между протоколами

При сравнении между протоколами статистически значимые различия показаны для теста n-back с пространственными стимулами ( $n = 3$ ) для разностей между T1 и T2, а также для теста Corsi blocks для разностей между T0 и T2 и между T1 и T2 (табл. 4). При попарном сравнении с помощью критерия Уилкоксона статистически значимые различия были обнаружены для теста n-back с пространственными стимулами ( $n = 3$ ) между протоколами iTBS-5/50 и iTBS-sham (эффект протокола iTBS-5/50 выше) ( $p_{\text{corr}} = 0,039$ ), для теста Corsi blocks — между точками T2 и T1 для протоколов iTBS-5/50 и iTBS-ind, а также iTBS-5/50 и iTBS-sham (эффект протокола iTBS-5/50 ниже по сравнению с остальными;  $p_{\text{corr}} = 0,038$  и  $0,048$  соответственно) (табл. 5).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследовании разработан персонализированный по индивидуальным частотам ТГС протокол iTBS лДЛПФК, получен опыт его применения на здоровых добровольцах и показан благоприятный профиль безопасности и переносимости. При сравнении со стандартным протоколом и имитацией стимуляции статистически значимых различий для большинства тестов получено не было. Статистически значимый эффект данного протокола был выявлен только в отношении теста на исполнительные функции (Tower of London). Показана эффективность стандартного протокола в отношении теста на пространственную РП и разделенное внимание (n-back с  $n = 3$ ), при этом изменение было статистически значимо выше по сравнению с имитацией стимуляции. С другой стороны, в более простом тесте на пространственную РП (Corsi blocks) после данного протокола наблюдали статистически незначимое ухудшение выполнения,

имеющее статистически значимые различия с имитацией стимуляции и персонализированным протоколом.

В отличие от полученных ранее данных, нам не удалось обнаружить преимуществ эффекта персонализированного протокола по сравнению со стандартным, также не было различий с имитацией стимуляции [18]. Выявленное уменьшение времени выполнения задания в тесте Tower of London может быть обусловлено обучением, поскольку такой же по направленности статистически значимый эффект наблюдали при имитации стимуляции. При этом по данному тесту не было обнаружено различий между протоколами. Возможно, отсутствие эффекта персонализированного протокола обусловлено деструктивной интерференцией ТМС-индуцированной активности с индивидуальными корковыми ритмами. Данное предположение согласуется с результатами исследований по применению протоколов транскраниальной стимуляции переменным током (tACS), когда эффект зависел от фазы тета-цикла, в которую подавался ток с гамма-частотой [23, 24]. В случае использования синхронизации тета-вспышек с эндогенным тета-ритмом ТМС-контроль возможен только при использовании "closed-loop" систем с одновременной регистрацией ЭЭГ и ТМС и синхронизацией стимулов с пиками индивидуального тета-ритма [25], при этом эффективность и целесообразность данного протокола нуждаются в изучении.

Показанное улучшение пространственной РП в ответ на одну сессию стандартного протокола iTBS согласуется с результатами некоторых других исследований [26, 27]. Особенность проведенного нами исследования — использование варианта теста n-back с одновременно предъявляемыми вербальными и пространственными стимулами, который оценивает показатели РП и разделенного внимания. При оценке теста с вербальными стимулами и суммарного показателя не было отмечено

Таблица 5. Попарные сравнения эффекта протоколов

Тест	Сравнение	iTBS-5/50 vs iTBS-ind	iTBS-5/50 vs iTBS-sham	iTBS-ind vs iTBS-sham
n-back (S, $n = 3$ )	pT2-T1	1	0,039	1
Corsi blocks	pT2-T0	0,186	0,105	1
	pT2-T1	0,033	0,048	1

**Примечание:** обозначения протоколов: iTBS-5/50 — стандартный протокол стимуляции тета-вспышками, iTBS-ind — персонализированный протокол iTBS, iTBS-sham — имитация стимуляции; pT2-T0 — уровень значимости при сравнении показателей между точками T2 и T0, pT2-T1 — уровень значимости при сравнении показателей между точками T2 и T1; S — пространственные стимулы, Corsi blocks — тест запоминания пространственной последовательности; статистически значимые различия обозначены полужирным шрифтом ( $p < 0,05$ , критерий Уилкоксона с поправкой на множественные сравнения).

статистически значимых различий, в связи с чем маловероятно, что обнаруживаемый эффект связан с изменением стратегии выполнения задания. На показатели другого теста на пространственную РП — Corsi blocks — стандартный протокол оказывал противоположно направленный эффект, т. е. уменьшение количества запоминаемых стимулов, хотя он был статистически незначимым. Возможным объяснением может быть влияние стимуляции лДЛПФК преимущественно на процессы обработки информации в РП или разделенное внимание, важные для выполнения теста n-back, в то время как для теста Corsi blocks большее значение имеет процесс удержания информации. Данный разнонаправленный эффект протокола на два важных компонента РП — удержание и обработку информации — хорошо согласуется с концепцией “игры с нулевой суммой”, согласно которой улучшение одной функции в ответ на стимуляцию сопровождается ухудшением другой и в конечном счете приводит к нулевому эффекту [28].

Возможным объяснением статистически значимых изменений тестирования только после стандартного протокола iTBS может быть тот факт, что стимуляция с частотами 5 и 50 Гц наиболее эффективна для индукции долговременной потенциации, как это было показано ранее на модельных животных [6]. Альтернативное объяснение может быть основано на предположении, что емкость РП определяется соотношением гамма/тета частот, и в таком случае стимуляция с частотой, меньшей индивидуального тета-ритма, приводит к увеличению емкости РП, что подтверждено в исследованиях с применением tACS [29, 30]. Подобный подход может быть реализован и с применением протоколов iTBS.

Все обнаруженные эффекты отмечены при отсроченном измерении (через час после начала стимуляции), в то время как при измерении непосредственно после стимуляции статистически значимых различий не выявлено ни для одного из протоколов. Длительность эффекта согласуется с полученными ранее результатами, согласно которым эффект на когнитивные функции отсутствует при измерении сразу после стимуляции, но выявляется при повторных измерениях в отсроченном периоде (60 мин

в проведенном нами исследовании, 20 и 40 мин — по литературным данным) [26]. Целесообразно в дальнейших исследованиях оценивать эффекты стимуляции не только непосредственно после ее завершения, но и на протяжении всего времени предполагаемого эффекта.

К ограничениям исследования можно отнести малый размер выборки, однако данной мощности достаточно для обнаружения «больших» эффектов. Кроме того, важное ограничение — вариабельность индивидуального ТГС и проблемы, связанные с выбором алгоритма его расчета. Отсутствие статистически значимого эффекта на показатели некоторых тестов (например, n-back с  $n = 2$ ; Digit span, Corsi blocks) может быть также обусловлено их низкой сложностью и «эффектом потолка». Еще одно ограничение — перекрестный дизайн, вследствие которого возможен эффект научения между сессиями. Однако возможное смещение вследствие научения минимизировано с помощью метода «латинских квадратов», кроме того, добровольцы проходили несколько тренировочных тестирований перед началом сессий стимуляции.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, показаны безопасность и переносимость персонализированного по индивидуальным частотам ТГС протокола стимуляции тета-вспышками лДЛПФК, однако не удалось подтвердить эффект на показатели когнитивных тестов. Протоколом, для которого был показан статистически значимый эффект, имевший различия с имитацией стимуляции, оказался стандартный протокол iTBS, в связи с чем может быть перспективным его дальнейшее исследование, например, у пациентов с когнитивными нарушениями. Учитывая полученные результаты, в будущих исследованиях представляется целесообразной проверка альтернативных гипотез, например, индивидуальной стимуляции с частотами ниже измеренных частот ТГС или синхронизированной с фазой тета-ритма стимуляции. Кроме того, необходимо дальнейшее изучение оптимальных алгоритмов расчета ТГС для улучшения точности и воспроизводимости измерения.

## Литература

1. Lefaucheur JP. Transcranial magnetic stimulation. *Handb Clin Neurol.* 2019; 160: 559–80. DOI: 10.1016/B978-0-444-64032-1.00037-0.
2. Lefaucheur JP, Aleman A, Baeken C, Benninger DH, Brunelin J, Di Lazzaro V et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): An update (2014–2018). *Clin Neurophysiol.* 2020; 131 (2): 474–528. DOI: 10.1016/j.clinph.2019.11.002.
3. Begemann MJ, Brand BA, Ćurčić-Blake B, Aleman A, Sommer IE. Efficacy of non-invasive brain stimulation on cognitive functioning in brain disorders: a meta-analysis. *Psychol Med.* 2020; 50 (15): 2465–86. DOI: 10.1017/S0033291720003670.
4. Chervyakov AV, Chernyavsky AY, Sinitsyn DO, Piradov MA. Possible mechanisms underlying the therapeutic effects of transcranial magnetic stimulation. *Front Hum Neurosci.* 2015; 9: 303. DOI: 10.3389/fnhum.2015.00303.
5. Tang A, Thickbroom G, Rodger J. Repetitive transcranial magnetic stimulation of the brain: mechanisms from animal and experimental models. *Neuroscientist.* 2017; 23 (1): 82–94. DOI: 10.1177/1073858415618897.
6. Larson J, Munkácsy E. Theta-burst LTP. *Brain Res.* 2015; 1621: 38–50. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.10.034.
7. Rounis E, Huang YZ. Theta burst stimulation in humans: a need for better understanding effects of brain stimulation in health and disease. *Exp Brain Res.* 2020; 238 (7–8): 1707–14. DOI: 10.1007/s00221-020-05880-1.
8. Wischnewski M, Schutter DJ. Efficacy and time course of theta burst stimulation in healthy humans. *Brain Stimul.* 2015; 8 (4): 685–92. DOI: 10.1016/j.brs.2015.03.004.
9. Pabst A, Proksch S, Médé B, Comstock DC, Ross JM, Balasubramaniam R. A systematic review and meta-analysis of the efficacy of intermittent theta burst stimulation (iTBS) on cognitive enhancement. *Neurosci Biobehav Rev.* 2022; 135: 104587. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2022.104587.
10. Бакулин И. С., Забирова А. Х., Пойдашева А. Г., Синецын Д. О., Лагода Д. Ю., Супонева Н. А. и др. Эффект основанных на метапластичности протоколов транскраниальной стимуляции тета-вспышками на показатели рабочей памяти. *Вестник РГМУ.* 2023; 2: 33–41. DOI: 10.24075/vrgmu.2023.011.
11. Philip NS, Leuchter AF, Cook IA, Massaro J, Goethe JW, Carpenter LL. Predictors of response to synchronized transcranial magnetic stimulation for major depressive disorder. *Depress Anxiety.* 2019;

- 36: 278–85. DOI: 10.1002/da.22862.
12. Brownjohn PW, Reynolds JN, Matheson N, Fox J, Shemmell JB. The effects of individualized theta burst stimulation on the excitability of the human motor system. *Brain Stimul.* 2014; 7 (2): 260–8. DOI: 10.1016/j.brs.2013.12.007.
  13. Пойдашева А. Г., Бакулин И. С., Синицын Д. О., Забирова А. Х., Лагода Д. Ю., Супонева Н. А. и др. Фазово-амплитудное тета-гамма сопряжение: физиологические основы, методы анализа и перспективы трансляции в клиническую практику. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2022; 16 (4): 71–9. DOI: 10.54101/ACEN.2022.4.9.
  14. Lisman JE, Jensen O. The  $\theta$ - $\gamma$  neural code. *Neuron.* 2013; 77 (6): 1002–16. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.03.007.
  15. Brooks H, Goodman MS, Bowie CR, Zomorodi R, Blumberger DM, Batters MA, et al. Theta-gamma coupling and ordering information: a stable brain-behavior relationship across cognitive tasks and clinical conditions. *Neuropsychopharmacology.* 2020; 45 (12): 2038–47. DOI: 10.1038/s41386-020-0759-z.
  16. Abubaker M, Al Qasem W, Kvašňák E. Working memory and cross-frequency coupling of neuronal oscillations. *Front Psychol.* 2021; 12: 756661. DOI: 10.3389/fpsyg.2021.756661.
  17. Goodman MS, Kumar S, Zomorodi R, Ghazala Z, Cheam ASM, Barr MS et al. Theta-gamma coupling and working memory in Alzheimer's dementia and mild cognitive impairment. *Front Aging Neurosci.* 2018; 10: 101. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00101.
  18. Chung SW, Sullivan CM, Rogasch NC, Hoy KE, Bailey NW, Cash RFH, et al. The effects of individualised intermittent theta burst stimulation in the prefrontal cortex: a TMS-EEG study. *Hum Brain Mapp.* 2019; 40 (2): 608–27. DOI: 10.1002/hbm.24398.
  19. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia.* 1971; 9 (1): 97–113.
  20. Mueller ST, Piper BJ. The Psychology Experiment Building Language (PEBL) and PEBL Test Battery. *J Neurosci Methods.* 2014; 222: 250–9. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2013.10.024.
  21. Kirchner WK. Age differences in short-term retention of rapidly changing information. *J Exp Psychol.* 1958; 55 (4): 352–8. DOI: 10.1037/h0043688.
  22. Haatveit BC, Sundet K, Hugdahl K, Ueland T, Melle I, Andreassen OA. The validity of d prime as a working memory index: results from the "Bergen n-back task". *J Clin Exp Neuropsychol.* 2010; 32 (8): 871–80. DOI: 10.1080/13803391003596421.
  23. Turi Z, Mittner M, Lehr A, Bürger H, Antal A, Paulus W.  $\theta$ - $\gamma$  Cross-Frequency Transcranial Alternating Current Stimulation over the Trough Impairs Cognitive Control. *eNeuro.* 2020; 7 (5): ENEURO.0126-20.2020. DOI: 10.1523/ENEURO.0126-20.2020.
  24. Akkad H, Dupont-Hadwen J, Kane E, Evans C, Barrett L, Frese A, et al. Increasing human motor skill acquisition by driving theta-gamma coupling. *Elife.* 2021; 10: e67355. DOI: 10.7554/eLife.67355.
  25. Gordon PC, Belardinelli P, Stenroos M, Ziemann U, Zrenner C. Prefrontal theta phase-dependent rTMS-induced plasticity of cortical and behavioral responses in human cortex. *Brain Stimul.* 2022; 15 (2): 391–402. DOI: 10.1016/j.brs.2022.02.006.
  26. Hoy KE, Bailey N, Michael M, Fitzgibbon B, Rogasch NC, Saeki T, Fitzgerald PB. Enhancement of working memory and task-related oscillatory activity following intermittent Theta Burst Stimulation in healthy controls. *Cereb Cortex.* 2016; 26 (12): 4563–73. DOI: 10.1093/cercor/bhv193.
  27. Ngetich R, Jin D, Li W, Song B, Zhang J, Jin Z, Li L. Enhancing visuospatial working memory performance using intermittent Theta-Burst Stimulation over the right dorsolateral prefrontal cortex. *Front Hum Neurosci.* 2022; 16: 752519. DOI: 10.3389/fnhum.2022.752519.
  28. Brem AK, Fried PJ, Horvath JC, Robertson EM, Pascual-Leone A. Is neuroenhancement by noninvasive brain stimulation a net zero-sum proposition? *Neuroimage.* 2014; 85 Pt 3 (03): 1058–68. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2013.07.038.
  29. Vosskuhl J, Huster RJ, Herrmann CS. Increase in short-term memory capacity induced by down-regulating individual theta frequency via transcranial alternating current stimulation. *Front Hum Neurosci.* 2015; 9: 257. DOI: 10.3389/fnhum.2015.00257.
  30. Wolinski N, Cooper NR, Sauseng P, Romei V. The speed of parietal theta frequency drives visuospatial working memory capacity. *PLoS Biol.* 2018; 16 (3): e2005348. DOI: 10.1371/journal.pbio.2005348.

## References

1. Lefaucheur JP. Transcranial magnetic stimulation. *Handb Clin Neurol.* 2019; 160: 559–80. DOI: 10.1016/B978-0-444-64032-1.00037-0.
2. Lefaucheur JP, Aleman A, Baeken C, Benninger DH, Brunelin J, Di Lazzaro V et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): An update (2014–2018). *Clin Neurophysiol.* 2020; 131 (2): 474–528. DOI: 10.1016/j.clinph.2019.11.002.
3. Begemann MJ, Brand BA, Ćurčić-Blake B, Aleman A, Sommer IE. Efficacy of non-invasive brain stimulation on cognitive functioning in brain disorders: a meta-analysis. *Psychol Med.* 2020; 50 (15): 2465–86. DOI: 10.1017/S0033291720003670.
4. Chervyakov AV, Chernyavsky AY, Sinitsyn DO, Piradov MA. Possible mechanisms underlying the therapeutic effects of transcranial magnetic stimulation. *Front Hum Neurosci.* 2015; 9: 303. DOI: 10.3389/fnhum.2015.00303.
5. Tang A, Thickbroom G, Rodger J. Repetitive transcranial magnetic stimulation of the brain: mechanisms from animal and experimental models. *Neuroscientist.* 2017; 23 (1): 82–94. DOI: 10.1177/1073858415618897.
6. Larson J, Munkácsy E. Theta-burst LTP. *Brain Res.* 2015; 1621: 38–50. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.10.034.
7. Rounis E, Huang YZ. Theta burst stimulation in humans: a need for better understanding effects of brain stimulation in health and disease. *Exp Brain Res.* 2020; 238 (7–8): 1707–14. DOI: 10.1007/s00221-020-05880-1.
8. Wischniewski M, Schutter DJ. Efficacy and time course of theta burst stimulation in healthy humans. *Brain Stimul.* 2015; 8 (4): 685–92. DOI: 10.1016/j.brs.2015.03.004.
9. Pabst A, Proksch S, Médé B, Comstock DC, Ross JM, Balasubramaniam R. A systematic review and meta-analysis of the efficacy of intermittent theta burst stimulation (iTBS) on cognitive enhancement. *Neurosci Biobehav Rev.* 2022; 135: 104587. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2022.104587.
10. Bakulin IS, Zaborova AH, Poydasheva AG, Sinitsyn DO, Lagoda DY, Suponeva NA, et al. Effects of the metaplasticity-based theta-burst transcranial stimulation protocols on working memory performance. *Bulletin of RSMU.* 2023; 2: 33–41. DOI: 10.24075/vrgmu.2023.011. Russian.
11. Philip NS, Leuchter AF, Cook IA, Massaro J, Goethe JW, Carpenter LL. Predictors of response to synchronized transcranial magnetic stimulation for major depressive disorder. *Depress Anxiety.* 2019; 36: 278–85. DOI: 10.1002/da.22862.
12. Brownjohn PW, Reynolds JN, Matheson N, Fox J, Shemmell JB. The effects of individualized theta burst stimulation on the excitability of the human motor system. *Brain Stimul.* 2014; 7 (2): 260–8. DOI: 10.1016/j.brs.2013.12.007.
13. Poydasheva AG, Bakulin IS, Sinitsyn DO, Zaborova AH, Lagoda DY, Suponeva NA, et al. Literature review on theta-gamma phase-amplitude coupling: physiological basics, analysis methods, and perspectives of translation into clinical practice. *Annals of Clinical and Experimental Neurology.* 2022; 16 (4): 71–9. DOI: 10.54101/ACEN.2022.4.9. Russian.
14. Lisman JE, Jensen O. The  $\theta$ - $\gamma$  neural code. *Neuron.* 2013; 77 (6): 1002–16. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.03.007.
15. Brooks H, Goodman MS, Bowie CR, Zomorodi R, Blumberger DM, Batters MA, et al. Theta-gamma coupling and ordering information: a stable brain-behavior relationship across cognitive tasks and clinical conditions. *Neuropsychopharmacology.* 2020; 45 (12): 2038–47. DOI: 10.1038/s41386-020-0759-z.
16. Abubaker M, Al Qasem W, Kvašňák E. Working memory and cross-frequency coupling of neuronal oscillations. *Front Psychol.* 2021; 12: 756661. DOI: 10.3389/fpsyg.2021.756661.
17. Goodman MS, Kumar S, Zomorodi R, Ghazala Z, Cheam ASM,

- Barr MS et al. Theta-gamma coupling and working memory in Alzheimer's dementia and mild cognitive impairment. *Front Aging Neurosci.* 2018; 10: 101. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00101.
18. Chung SW, Sullivan CM, Rogasch NC, Hoy KE, Bailey NW, Cash RFH, et al. The effects of individualised intermittent theta burst stimulation in the prefrontal cortex: a TMS-EEG study. *Hum Brain Mapp.* 2019; 40 (2): 608–27. DOI: 10.1002/hbm.24398.
  19. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia.* 1971; 9 (1): 97–113.
  20. Mueller ST, Piper BJ. The Psychology Experiment Building Language (PEBL) and PEBL Test Battery. *J Neurosci Methods.* 2014; 222: 250–9. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2013.10.024.
  21. Kirchner WK. Age differences in short-term retention of rapidly changing information. *J Exp Psychol.* 1958; 55 (4): 352–8. DOI: 10.1037/h0043688.
  22. Haatveit BC, Sundet K, Hugdahl K, Ueland T, Melle I, Andreassen OA. The validity of d prime as a working memory index: results from the "Bergen n-back task". *J Clin Exp Neuropsychol.* 2010; 32 (8): 871–80. DOI: 10.1080/13803391003596421.
  23. Turi Z, Mittner M, Lehr A, Bürger H, Antal A, Paulus W.  $\theta$ - $\gamma$  Cross-Frequency Transcranial Alternating Current Stimulation over the Trough Impairs Cognitive Control. *eNeuro.* 2020; 7 (5): ENEURO.0126-20.2020. DOI: 10.1523/ENEURO.0126-20.2020.
  24. Akkad H, Dupont-Hadwen J, Kane E, Evans C, Barrett L, Frese A, et al. Increasing human motor skill acquisition by driving theta-gamma coupling. *Elife.* 2021; 10: e67355. DOI: 10.7554/eLife.67355.
  25. Gordon PC, Belardinelli P, Stenroos M, Ziemann U, Zrenner C. Prefrontal theta phase-dependent rTMS-induced plasticity of cortical and behavioral responses in human cortex. *Brain Stimul.* 2022; 15 (2): 391–402. DOI: 10.1016/j.brs.2022.02.006.
  26. Hoy KE, Bailey N, Michael M, Fitzgibbon B, Rogasch NC, Saeki T, Fitzgerald PB. Enhancement of working memory and task-related oscillatory activity following intermittent Theta Burst Stimulation in healthy controls. *Cereb Cortex.* 2016; 26 (12): 4563–73. DOI: 10.1093/cercor/bhv193.
  27. Ngetich R, Jin D, Li W, Song B, Zhang J, Jin Z, Li L. Enhancing visuospatial working memory performance using intermittent Theta-Burst Stimulation over the right dorsolateral prefrontal cortex. *Front Hum Neurosci.* 2022; 16: 752519. DOI: 10.3389/fnhum.2022.752519.
  28. Brem AK, Fried PJ, Horvath JC, Robertson EM, Pascual-Leone A. Is neuroenhancement by noninvasive brain stimulation a net zero-sum proposition? *Neuroimage.* 2014; 85 Pt 3 (03): 1058–68. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2013.07.038.
  29. Vosskuhl J, Huster RJ, Herrmann CS. Increase in short-term memory capacity induced by down-regulating individual theta frequency via transcranial alternating current stimulation. *Front Hum Neurosci.* 2015; 9: 257. DOI: 10.3389/fnhum.2015.00257.
  30. Wolinski N, Cooper NR, Sauseng P, Romei V. The speed of parietal theta frequency drives visuospatial working memory capacity. *PLoS Biol.* 2018; 16 (3): e2005348. DOI: 10.1371/journal.pbio.2005348.

## ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ИСХОДОВ ПРОГРАММ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ «СЛУЧАЙНЫЙ ЛЕС»

Г. М. Владимирский<sup>1</sup>, М. А. Журавлева<sup>1</sup>, А. Э. Дашиева<sup>2</sup>✉, И. Е. Корнеева<sup>2</sup>, Т. А. Назаренко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с переносом эмбрионов в настоящее время являются основными методами лечения всех форм бесплодия, однако успешные случаи, заканчивающиеся наступлением беременности, по-прежнему составляют лишь треть из числа всех проведенных циклов. Для оценки результатов лечения бесплодия методом ЭКО необходимо учитывать множество показателей и изучать взаимосвязь между ними. За последние десятилетия был разработан ряд моделей прогнозирования ЭКО для оценки индивидуальных результатов лечения, но лишь немногие из них оказались клинически значимыми, из-за их плохой прогностической способности. Целью исследования было создать нелинейные модели прогнозирования исходов ЭКО и выявить наиболее значимые факторы, влияющие на результат лечения. На основе базы данных, содержащей информацию по более чем 700 показателям 7004 женщин в возрасте от 18 лет до 45 лет, прошедших лечение в программе ЭКО на территории Российской Федерации с 2010 по 2020 г., была обучена модель «Случайного леса», прогнозирующая беременность в цикле ЭКО с ROC-AUC = 0,69. Описаны 20 самых успешных предикторов полученной модели с интерпретацией их вклада в прогнозирование. Из них индекс массы тела (ИМТ), число полученных и оплодотворившихся ооцитов описаны в научной литературе как предикторы исхода программ ЭКО, в то время как другие признаки, например анамнестические данные, количество и исходы предыдущих программ ЭКО, а также сывороточная концентрация АМГ, редко фигурируют в зарубежных прогностических моделях.

**Ключевые слова:** ЭКО, бесплодие, прогностическая модель, «Случайный лес»

**Вклад авторов:** Г. М. Владимирский — обучение прогностических моделей, анализ литературы, выбор методов исследования; М. А. Журавлева — предобработка и анализ данных, анализ литературы, написание рукописи; А. Э. Дашиева — обработка исходного материала, анализ результатов; И. Е. Корнеева, Т. А. Назаренко — разработка анкеты для базы данных, редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Аюна Эрдэмовна Дашиева  
ул. Академика Опарина, д. 4Б, г. Москва, 117198, Россия, dr.dashieva@mail.ru

**Статья получена:** 24.11.2023 **Статья принята к печати:** 19.12.2023 **Опубликована онлайн:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.057

## PREDICTING THE OUTCOMES OF *IN VITRO* FERTILIZATION PROGRAMS USING A RANDOM FOREST MACHINE LEARNING MODEL

Vladimirsky GM<sup>1</sup>, Zhuravleva MA<sup>1</sup>, Dashieva AE<sup>2</sup>✉, Korneeva IE<sup>2</sup>, Nazarenko TA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Higher School of Economics National Research University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Kulakov National Medical Scientific Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatal Medicine, Moscow, Russia

Currently, *in vitro* fertilization (IVF) with embryo transfer is the main method of treatment of all forms of infertility, but successful cases ending in pregnancy still account for only a third of all cycles performed. It is necessary to take into account many parameters and investigate the connections between them in order to properly evaluate the results of IVF. Over the past decades, a number of IVF prediction models have been developed with the aim at assessing the outcomes in individual cases, but, given the generally poor prognostic capacity, only a few of them have proven to be clinically significant. This study aimed to create nonlinear IVF outcomes prediction models and identify the most significant factors affecting the said outcomes. Using a database containing information on more than 700 indicators of 7004 women aged 18 to 45 years who participated in the IVF program in Russia from 2010 to 2020, we trained a random forest model that predicted pregnancy in the IVF cycle with ROC-AUC = 0.69. This paper describes 20 most successful predictors of the resulting model and interprets their contribution to the prognosis. Of these, body mass index (BMI) and the number of received and fertilized oocytes have been covered in the scientific literature previously as predictors of IVF outcomes, but other parameters, such as anamnestic data, previous participation in an IVF program (number of cases and their results), as well as serum concentration of AMH, rarely appear in foreign prognostic models.

**Keywords:** IVF, infertility, prognostic model, random forest

**Author contribution:** Vladimirsky GM — predictive models training, literature analysis, choice of research methods; Zhuravleva MA — preprocessing and analysis of data, literature analysis, manuscript authoring; Dashieva AE — processing of source material, analysis of results; Korneeva IE, Nazarenko TA — development of the survey for the database, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ayuna E. Dashieva,  
Akademika Oparina, 4B, Moscow, 117198, Russia, dr.dashieva@mail.ru

**Received:** 24.11.2023 **Accepted:** 19.12.2023 **Published online:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.057

Бесплодие — проблема, затрагивающая десятки миллионов семей. Развитие вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) принесло надежду таким парам стать родителями. Согласно отчету РАРЧ в 2020 г. в Российской Федерации (РФ) было выполнено 148 660 циклов ВРТ, родилось около 34 250 детей. Однако, несмотря на удовлетворенность потребности населения в этом методе лечения бесплодия, частота наступления клинической беременности в расчете на один перенос эмбриона составляет 34,8% [1]. Поскольку вероятность успеха

ЭКО зависит от многих факторов, усложняющих оценку результативности циклов, разработка инструмента принятия решений, основанного на анализе этих факторов, могла бы улучшить качество медицинской помощи и консультирования пациенток, проходящих лечение в программе ЭКО.

В научной литературе предложен ряд моделей машинного обучения, прогнозирующих исходы ЭКО и предлагающих идентификацию наиболее важных для предсказания характеристик женщин и протокола программы [2].

Наиболее распространенный подход к прогнозированию результатов ЭКО — использование линейных моделей. В обзоре 2020 г. выявлено 35 таких моделей, все из них основаны либо на логистической регрессии, либо на регрессии Кокса [3]. Часто в таких исследованиях качество моделей не оценивают, хотя для этого существуют предпочтительные способы, например ROC-AUC и с-статистика. Для качественной оценки прогностических моделей используют ROC-анализ с построением ROC-кривой (от англ. Receiver operating characteristic). ROC-анализ заключается в построении четырехпольных таблиц с оценкой чувствительности и специфичности модели. ROC-кривая — график, позволяющий дать оценку качеству модели по разделению двух классов. По оси ординат отложены значения частоты истинно положительных результатов (чувствительность), по оси абсцисс — частоты ложноположительных результатов (специфичность). Значения по осям соответствуют значениям от 0 до 1 (т. е. от 0 до 100%). Полученная кривая показывает зависимость верно классифицированных положительных примеров от количества неверно классифицированных отрицательных примеров. Для идеального классификатора график ROC-кривой проходит через верхний левый угол, где доля истинно положительных случаев составляет 1,0 или 100% (идеальная чувствительность), а доля ложноположительных примеров равна 0. Кроме графика ROC-кривой, для оценки качества модели используют характеристику площади под кривой ROC-AUC (Area under ROC). Чем больше показатель AUC, тем лучшей прогностической силой обладает модель. Чаще показатель AUC предназначен для сравнительного анализа нескольких моделей. Значения ROC-AUC при прогнозировании результатов ЭКО в литературных источниках варьируют от 0,58 до 0,73 [3–12].

Линейные прогностические модели успеха ЭКО обычно включают в себя около семи признаков. Наиболее распространенными оказываются возраст женщины, причины бесплодия, исход предыдущих беременностей и программ ЭКО, число полученных ооцитов и перенесенных эмбрионов и полученных ооцитов [4, 5, 9–11]. Некоторые исследователи предполагают, что ограниченное число признаков, переходящих от исследования к исследованию, приводит к скромной прогностической способности моделей, и выступают за выявление новых факторов, связанных с успехами и неуспехами процедуры [13].

Несмотря на распространенность моделей логистической регрессии, они имеют ряд недостатков. Так, например, в ряде исследований было обнаружено, что взаимосвязь между некоторыми ключевыми характеристиками, такими как возраст женщины, количество полученных яйцеклеток, год начала лечения, и успехом ЭКО нелинейна [10, 11]. В таких случаях возможно применение функции кубического сплайна с целью интерполяции данных (например, возраста) для придания линейным моделям нелинейности либо полиномиальное преобразование данных [8, 10, 11]. Тем не менее, подобные модификации линейных моделей все еще основаны на простой (полиномиальной) зависимости между целевой переменной и признаками.

Кроме того, модели логистической регрессии, будучи интерпретируемыми, не имеют высокой прогностической способности. Поэтому многие исследователи обратились к нелинейным неинтерпретируемым моделям машинного обучения, которые охватывают такие методы, как «Случайный лес», градиентный бустинг и нейронные сети. Среди этих методов «Случайный лес» и градиентный бустинг часто рассматривают как самые современные для

задач бинарной классификации с табличными данными, поскольку они, как правило, превосходят другие методы с точки зрения точности и обобщения [2]. Как правило, площадь под кривой ROC для подобных моделей, колеблется от 0,68 до 0,86, что выше, чем у линейных классификаторов [14–16].

Основное ограничение в использовании нелинейных неинтерпретируемых моделей — сложность оценки вклада отдельных признаков в предсказание моделей. Тем не менее, разработанные в последние годы методы предлагают возможность интерпретации признаков для любых моделей машинного обучения вне зависимости от их сложности. В настоящем исследовании применен метод SHAP, основанный на значении Шепли, концепции из кооперативной теории игр. В нем аппроксимированное значение Шепли (средний вклад признака во все коалиции признаков) использовано для вычисления вклада каждого признака в прогноз модели [17], что позволит более точно прогнозировать исходы программ ЭКО.

Цель настоящего исследования — построить нелинейные модели прогнозирования исходов ЭКО и выявить наиболее значимые факторы, влияющие на результат лечения.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Клинический материал исследования

Для построения модели использовали данные, включающие характеристики и результаты программ ЭКО 7004 женщин, прошедших лечение в 17 клиниках ВРТ на территории РФ в период с 2011 по 2020 г. Критерии включения: возраст женщин от 18 лет до 45 лет с любыми факторами бесплодия (N97). Критерии исключения: противопоказания для проведения ВРТ и вынашивания беременности (согласно Приказу МЗ РФ от 31 июля 2020 г. № 803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»).

Распределение клиник, участвующих в исследовании в субъектах РФ, представлено на рис. 1. Сбор материала осуществляли путем заполнения специалистами клиник специально разработанных анкет, содержащих 770 признаков. Получаемые данные содержали несколько блоков информации: социальные характеристики пациентов (124 вопроса), данные анамнеза (171 вопроса), куда вошли данные о состоянии соматического здоровья (58 вопросов), состоянии гинекологического здоровья (108 вопросов), истории бесплодия и методов лечения (73 вопроса), данные лабораторного обследования (6 пунктов), данные о партнере пациентки (210 вопросов), данные протокола овариальной стимуляции (7 вопросов) и эмбриологического этапа (30 вопросов), поддержки лютеиновой фазы, исхода программы ЭКО.

### Обработка и анализ данных

Предобработка данных для модели включала в себя отбор минимального значения среди нескольких анализов уровня гормонов в сыворотке крови (антимюллеровый гормон, или АМГ; фолликулостимулирующий гормон, или ФСГ; лютеинизирующий гормон, или ЛГ; тиреотропный гормон, ТТГ; пролактин). Разреженные и дублирующиеся данные были удалены, что сократило число признаков до 408. Пропуски в данных были заполнены средними



Рис. 1. Географический охват исследования

значениями. Для статистического анализа использовали отношение шансов (ОШ) [18]. Расчет  $p$ -value по полученному отношению шансов производили в соответствии с источником [19].

#### Отбор и интерпретация важности признаков

В данном исследовании применяли метод «Случайного леса» (Random forest) — метод машинного обучения, использующий ансамбль деревьев решений (decision tree) для задач классификации. Каждое отдельное дерево в таком лесу дает предсказание класса, и набравший наибольшее количество голосов класс становится предсказанием. Данная работа направлена на предсказание наступления беременности после процедуры программы ЭКО.

Для интерпретации важности признаков после использования модели «Случайного леса» использовали

показатель важности Джини. Он позволяет сравнить распределение признака в выборке с различным числом единиц [20]. Использованная для выделения признаков модель имела гиперпараметры (параметры, настраиваемые вручную перед обучением модели), максимизирующие значение метрики ROC-AUC на пятикратной кросс-валидации, и была впоследствии обучена на полном датасете (наборе данных в машинном обучении). С целью отбора оптимального числа признаков для предсказания использовали метод рекурсивного отбора признаков с пятикратной кросс-валидацией, в рамках которого на каждом этапе из признаков модели удалял признак, имеющий минимальную важность Джини в модели. Все вышеперечисленные методы были использованы в реализации библиотеки scikit-learn [21]. В рамках расширенной интерпретации признаков задействовали метод SHAP [17], подходящий для интерпретации значимости признаков для нелинейных моделей.

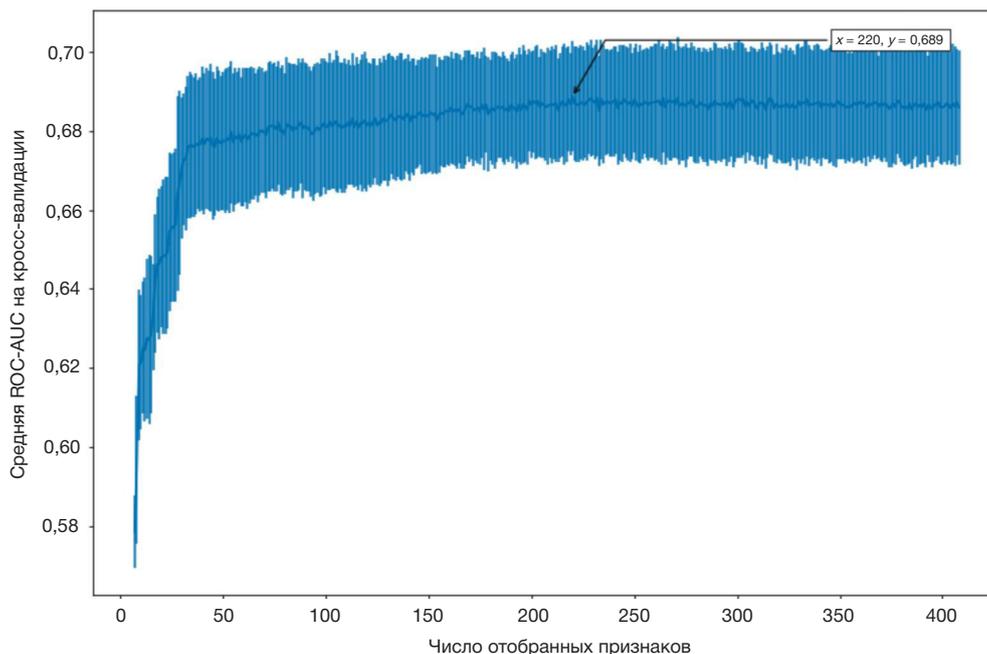


Рис. 2. График среднего ROC-AUC на кросс-валидации при элиминации признаков. На графике отмечена точка с максимальным ROC-AUC, а также среднее квадратичное отклонение ROC-AUC в кросс-валидации

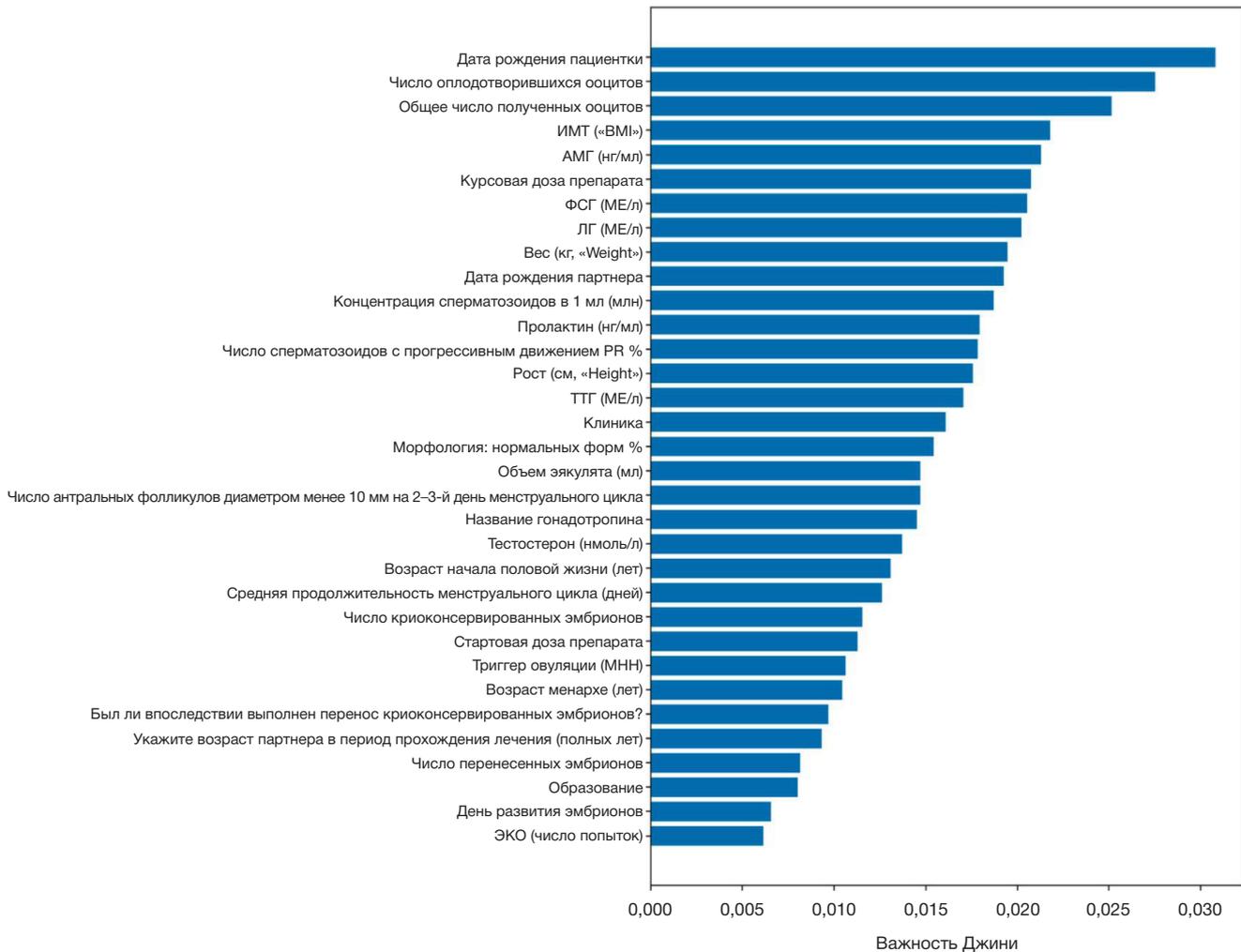


Рис. 3. Важность Джины для 33 лучших признаков, полученная при обучении «Случайного леса» на 220 признаках

### Используемые модели

Ввиду наличия большого количества бинарных и категориальных признаков, а также существования нелинейных зависимостей между признаками и целевой переменной, в качестве основного классификатора была выбрана модель «Случайного леса», реализованная в библиотеке scikit-learn [21]. Параметры модели были выбраны с использованием метода GridSearch с пятикратной кросс-валидацией [21], оценка качества модели происходила с использованием показателя ROC-AUC, который менее чувствителен к дисбалансу классов, наблюдаемому в данных. Наилучшими параметрами для модели «Случайного леса» оказались максимальная глубина, равная 50, минимальное число объектов в листе, равное 2, и общее число деревьев, равное 2000. Кроме того, в этом исследовании была протестирована модель классификатора Catboost [22]. Catboost был выбран из-за встроенной поддержки категориальных признаков, отличающей его от других реализаций алгоритма градиентного бустинга. Роль целевой переменной для всех обученных моделей играло наличие беременности у женщины.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использование рекурсивного отбора признаков показало, что максимального значения метрики ROC-AUC можно

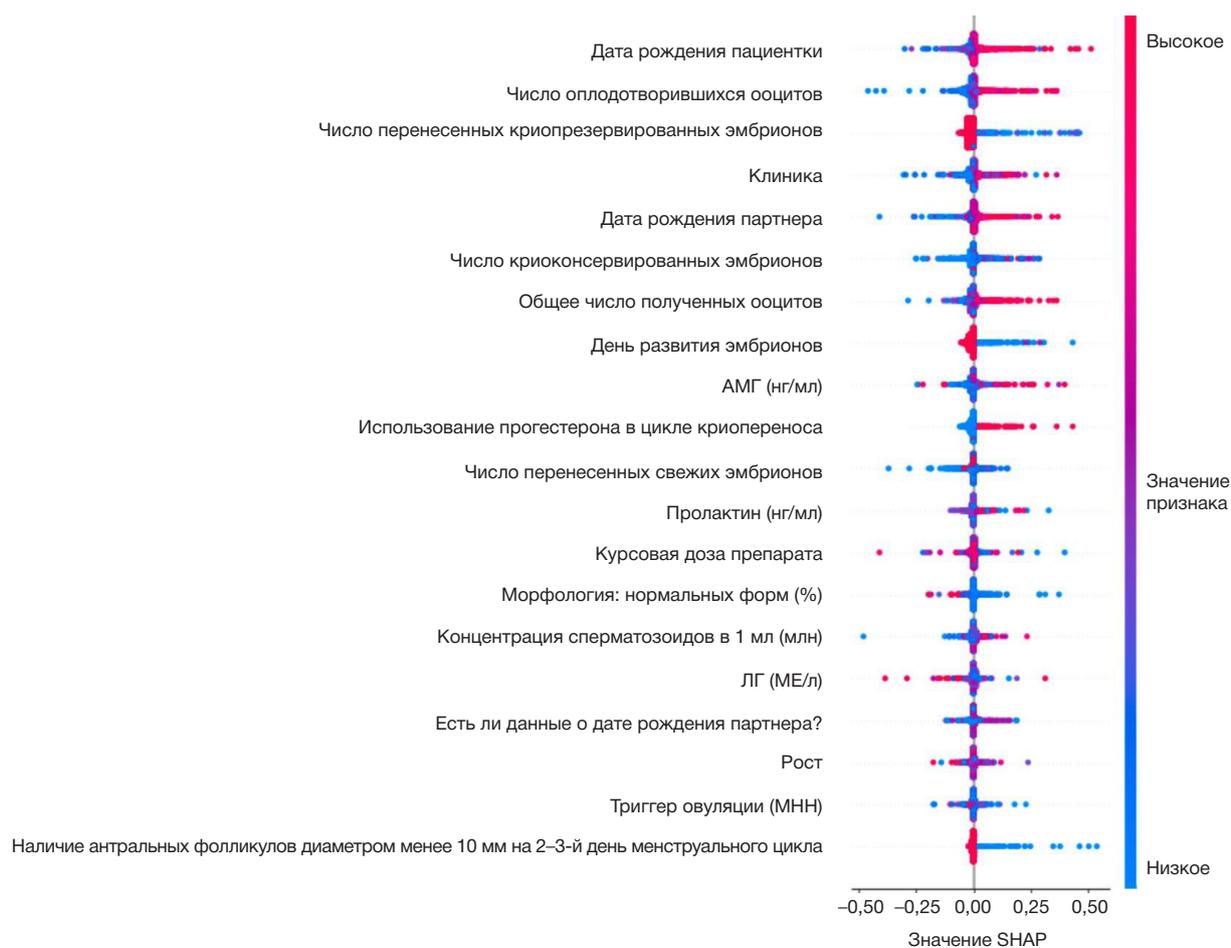
достигнуть при обучении «Случайного леса» на 220 признаках, и оно составляет 0,69. Максимальный ROC-AUC Catboost на кросс-валидации составил 0,68, поэтому для дальнейшего анализа использовали более удобную в интерпретации модель «Случайного леса». Графическая иллюстрация изменения метрики ROC-AUC при постепенном удалении признаков для модели «Случайного леса» представлена на рис. 2.

При постепенном удалении признаков значение метрики в начале изменяется незначительно, начиная резко падать только при количестве признаков меньше 33. Поэтому в качестве оптимального количества признаков в модели было выбрано число 33, а модель, обученная на этих признаках, позволяет добиться значения ROC-AUC, равного 0,69.

Важность 20 признаков, дающих наибольший вклад в предсказание полученной модели, была проанализирована при помощи критерия важности Джины (рис. 3).

Наиболее значимыми для предсказания признаками оказались дата рождения пациентки (возраст), количество оплодотворившихся ооцитов и общее число полученных ооцитов — показатели, сопоставимые с международными исследованиями [16].

Уровни АМГ в сыворотке крови имели наибольший вес в предсказании по сравнению с другими показателями содержания гормонов, однако в международных исследованиях этот признак используют значительно реже, чем параметры гонадотропных гормонов (ФСГ



**Рис. 4.** Диаграмма, отражающая значения SHAP для 20 самых важных, в соответствии с методом SHAP, признаков. Положительный класс означает успех ЭКО, а отрицательный — неудачу процедуры

и ЛГ [8]. Заметный вклад в предсказание вносила также клиника, в которой проводили ЭКО.

Методом SHAP был проведен дополнительный анализ 20 лучших признаков. Увеличение значений таких признаков, как количество оплодотворенных ооцитов, дата рождения пациентки, уровень АМГ, использование прогестерона в лютеиновой фазе цикла, увеличивают вероятность предсказания успеха ЭКО моделью (рис. 4).

Нами были построены модели, предсказывающие исход программы ЭКО для отдельных диагнозов бесплодия. Полученные значения ROC-AUC не превосходили значения метрики, полученной для всей выборки, из чего можно сделать вывод, что использование моделей для отдельных типов бесплодия нецелесообразно (таблица).

У женщин с безуспешными программами в прошлом вероятность успешного исхода ЭКО ниже, чем у женщин с первой попыткой ЭКО или с прошлыми успешными попытками (ОШ = 0,7675;  $p < 0,0001$ ), поэтому неудивительно, что переменная, показывающая число прошлых попыток, фигурирует в значимых признаках, отобранных «Случайным лесом» — классификатором, показавшим лучшие результаты при кросс-валидации. Тем не менее, мы считаем модель, описанную нами, более релевантной для российской популяции, чем зарубежные модели, описанные в литературных источниках.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно полученным нами данным, качество текущей прогностической модели «Случайного леса» (ROC-

AUC = 0,69) было сопоставимо с качеством аналогичных зарубежных моделей. Так лучшая модель в недавнем исследовании показала качество ROC-AUC 0,68 [14].

Несмотря на сопоставимость значений ROC-AUC нашей модели и моделей, описанных в литературе, даже если эти модели имеют одинаковую целевую переменную они, чаще всего, включают в себя различные критерии отбора пар. Так, часть моделей, представленных в литературе, не содержит информации о прошлых попытках ЭКО женщины, и предполагается только вероятность успеха в первом цикле лечения [14]. Полученная нами модель ЭКО опирается на результаты предыдущих программ. В обучающих данных, использованных нами, 40,9% женщин имели в анамнезе безуспешные попытки ЭКО. Преимуществом нашей модели является возможность предсказывать вероятность успеха ЭКО для одного цикла. В то время как некоторые модели, опубликованные в литературе, предсказывают кумулятивный успех для нескольких циклов ЭКО [10, 11].

Все эти факторы делают сравнение моделей по численным показателям не до конца объективными. Например, можно предположить, что текущая модель имеет ROC-AUC выше, чем модель, описанная ранее [14], поскольку включает в себя информацию о предыдущих успехах ЭКО: так среди 40,9% женщин с прошлыми безуспешными попытками ЭКО, в 92,95% случаев следующие попытки ЭКО закончатся неудачами.

Оценивая результативность разработанной модели с клинических позиций, следует отметить, что нам удалось выделить наиболее важные предикторы успеха программы

**Таблица.** Результаты пятикратной кросс-валидации модели «Случайного леса» для отдельных диагнозов бесплодия при подборе гиперпараметров методом GridSearch

Диагноз бесплодия (МКБ-10)	Число пациентов	ROC-AUC
Женское бесплодие, связанное с отсутствием овуляции (N 97.0)	1279	0,69 ± 0,02
Женское бесплодие трубного происхождения (N 97.1)	3191	0,66 ± 0,02
Женское бесплодие маточного происхождения (N 97.2)	1248	0,66 ± 0,05
Женское бесплодие, связанное с мужским фактором (N 97.4)	3226	0,68 ± 0,01

ЭКО в популяции российских бесплодных пар. В числе этих признаков как хорошо известные (возраст женщины, число оплодотворенных ооцитов, число полученных ооцитов, ИМТ, уровень АМГ), так и не рассматриваемые ранее параметры. Например, было показано, что поддержка лютеиновой фазы препаратами прогестерона ассоциирована с успехом лечения. Хотя назначение прогестерона — рутинная клиническая тактика, до настоящего времени математически доказанного обоснования необходимости поддержки лютеиновой фазы индуцированного цикла не существовало. Кроме того, объективно подтверждено негативное влияние предыдущих неуспешных попыток ЭКО на последующую. Этот факт обуславливает, по всей видимости, необходимость пересмотра тактики лечения при нескольких (в настоящем исследовании — четырех) неудачных попытках ЭКО. Несмотря на то что на сегодняшний день ЭКО — рутинный метод преодоления бесплодия, и казалось бы, все клиники работают по стандартным протоколам и технологиям, модель выявила различия в результатах лечения в зависимости от клиники, предоставившей данные, что может стать основанием для клиник провести анализ своей работы. Интересным оказался факт отсутствия зависимости исходов программ

ЭКО от фактора бесплодия при наличии идентичности остальных, значимых параметров, что противоречит многочисленным исследованиям, пытающимся связать исходы ЭКО с нозологической формой бесплодия.

## Выводы

За последние десятилетия был разработан ряд моделей прогнозирования ЭКО для оценки индивидуальных результатов лечения, но лишь немногие из них оказались клинически значимыми из-за их недостаточной прогностической способности и используемых статистических методов. Машинное обучение, позволяющее интерпретировать данные и строить прогностические модели, все чаще применяют в клинической практике, особенно в сложных системах с несколькими переменными. В настоящем исследовании построена модель, предсказывающая исход циклов ЭКО с удовлетворительной эффективностью прогнозирования. Выделены важные факторы результативности ЭКО, обнаружены взаимодействия между ними. Мы продолжим работу по практическому применению модели для оценки влияния переменных на результативность лечения.

## Литература

1. Корсак В. С., Смирнова А. А., Шурыгина О. В. Регистр ВРТ Общероссийской общественной организации «Российская ассоциация репродукции человека». Отчет за 2020 год. Проблемы репродукции. 2022; 28 (6): 12–27. DOI: 10.17116/repro20222806112.
2. Hassan MR, Al-Insaf S, Hossain MI, Kamruzzaman J. A machine learning approach for prediction of pregnancy outcome following IVF treatment. *Neural Computing and Applications*. 2018; 32: 2283–97.
3. Ratna MB, Bhattacharya S, Abdulrahim B, McLernon DJ. A systematic review of the quality of clinical prediction models in in vitro fertilisation. *Human Reproduction*. 2020; 35: 100–116.
4. Lintsen A, Eijkemans M, Hunault C, Bouwmans C, Hakkaart L, Habbema J, et al. Predicting ongoing pregnancy chances after IVF and ICSI: A national prospective study. *Human Reproduction*. 2007; 22: 2455–62.
5. van Weert JM, Repping S, van der Steeg JW, Steures P, van der Veen F, Mol BW. A prediction model for ongoing pregnancy after in vitro fertilization in couples with male subfertility. *J Reprod Med*. 2008; 53 (4): 250–6. PMID: 18472647.
6. Jones CA, Christensen AL, Salihi H, Carpenter W, Petrozzino J, Abrams E, et al. Prediction of individual probabilities of livebirth and multiple birth events following in vitro fertilization (IVF): A new outcomes counselling tool for IVF providers and patients using HFEA metrics. *Journal of experimental clinical assisted reproduction*. 2011; 8: 3.
7. Nelson SM, Lawlor DA. Predicting live birth, preterm delivery, and low birth weight in infants born from in vitro fertilisation: A prospective study of 144,018 treatment cycles. *PLoS Medicine*. 2011; 8: e1000386.
8. van Loendersloot LL, van Wely M, Repping S, Bossuyt PMM, van der Veen F. Individualized decision-making in IVF: Calculating the chances of pregnancy. *Human Reproduction*. 2013; 28: 2972–80.
9. Dhillon R, McLernon D, Smith P, Fishel S, Dowell K, Deeks J, et al. Predicting the chance of live birth for women undergoing IVF: A novel pretreatment counselling tool. *Human Reproduction*. 2015; 31: 84–92.
10. McLernon DJ, Steyerberg EW, te Velde ER, Lee AJ, Bhattacharya S. Predicting the chances of a live birth after one or more complete cycles of in vitro fertilisation: Population based study of linked cycle data from 113 873 women. *BMJ*. 2016; p. i5735.
11. McLernon DJ, Raja EA, Toner JP, Baker VL, Doody KJ, Seifer DB. Predicting personalized cumulative live birth following in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 2022; 117 (2): 326–38.
12. Vaegter KK, Lakic TG, Olovsson M, Berglund L, Brodin T, Holte J. Which factors are most predictive for live birth after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) treatments? Analysis of 100 prospectively recorded variables in 8,400 IVF/ICSI single-embryo transfers. *Fertility and Sterility*. 2017; 107 (3): 641–48.
13. Ottosen LDM, Kesmodel U, Hindkjaer J, Ingerslev HJ. Pregnancy prediction models and eSET criteria for IVF patients—do we need more information? *Journal of assisted reproduction and genetics*.

- 2007; 24 (1): 29–36.
14. Xu T, d. F. Veiga A, Hammer KC, Paschalidis ICh, Mahalingaiah Sh. Informative predictors of pregnancy after first IVF cycle using eIVF practice highway electronic health records. *Scientific Reports*. 2022; 12: 1–9.
  15. C N Barreto N, Castro GZ, Pereira RG, Pereira FAN, Reis FM, Junior WM, et al. Predicting in vitro fertilization success in the Brazilian public health system: a machine learning approach. *Med Biol Eng Comput*. 2022; 60 (7): 1851–61. DOI: 10.1007/s11517-022-02569-1. Epub 2022 May 4. PMID: 35508786.
  16. Barnett-Itzhaki Z, Elbaz M, Butterman R, Amar D, Amitay M, Racowsky C, et al. Machine learning vs. classic statistics for the prediction of IVF outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020; 37: 2405–12.
  17. Lundberg S, Lee S-I. A unified approach to interpreting model predictions. Available from: <https://arxiv.org/abs/1705.07874>, may 22 2017.
  18. Morris JA, Gardner MJ. Statistics in Medicine: Calculating confidence intervals for relative risks (odds ratios) and standardised ratios and rates. *BMJ*. 1988; 296: 1313–6.
  19. Sheskin DJ. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. Chapman and Hall/CRC, 2003.
  20. Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. Classification and regression trees. Routledge, 2017.
  21. Cournapeau D, Brucher M, Perrot M, Duchesnay E. Scikit-learn: Machine learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*. 2011; 12: 2825–30.
  22. Prokhorenkova L, Gusev G, Vorobev A, Dorogush AV, Gulina A. Catboost: Unbiased boosting with categorical features. 2017. Available from: <https://arxiv.org/abs/1706.09516>.

## References

1. Korskak VS, Smirnova AA, Shurygina OV. Registr VRT Obshherossijskoj obshhestvennoj organizacii «Rossijskaja asociacija reprodukcii cheloveka». Otchet za 2020 god. *Problemy reprodukcii*. 2022; 28 (6): 12–27. DOI: 10.17116/repro20222806112. Russian.
2. Hassan MR, Al-Insaf S, Hossain MI, Kamruzzaman J. A machine learning approach for prediction of pregnancy outcome following IVF treatment. *Neural Computing and Applications*. 2018; 32: 2283–97.
3. Ratna MB, Bhattacharya S, Abdulrahim B, McLernon DJ. A systematic review of the quality of clinical prediction models in in vitro fertilisation. *Human Reproduction*. 2020; 35: 100–116.
4. Lintsen A, Eijkemans M, Hunault C, Bouwmans C, Hakkaart L, Habbema J, et al. Predicting ongoing pregnancy chances after IVF and ICSI: A national prospective study. *Human Reproduction*. 2007; 22: 2455–62.
5. van Weert JM, Repping S, van der Steeg JW, Steures P, van der Veen F, Mol BW. A prediction model for ongoing pregnancy after in vitro fertilization in couples with male subfertility. *J Reprod Med*. 2008; 53 (4): 250–6. PMID: 18472647.
6. Jones CA, Christensen AL, Salihi H, Carpenter W, Petrozzino J, Abrams E, et al. Prediction of individual probabilities of livebirth and multiple birth events following in vitro fertilization (IVF): A new outcomes counselling tool for IVF providers and patients using HFEA metrics. *Journal of experimental clinical assisted reproduction*. 2011; 8: 3.
7. Nelson SM, Lawlor DA. Predicting live birth, preterm delivery, and low birth weight in infants born from in vitro fertilisation: A prospective study of 144,018 treatment cycles. *PLoS Medicine*. 2011; 8: e1000386.
8. van Loendersloot LL, van Wely M, Repping S, Bossuyt PMM, van der Veen F. Individualized decision-making in IVF: Calculating the chances of pregnancy. *Human Reproduction*. 2013; 28: 2972–80.
9. Dhillon R, McLernon D, Smith P, Fishel S, Dowell K, Deeks J, et al. Predicting the chance of live birth for women undergoing IVF: A novel pretreatment counselling tool. *Human Reproduction*. 2015; 31: 84–92.
10. McLernon DJ, Steyerberg EW, te Velde ER, Lee AJ, Bhattacharya S. Predicting the chances of a live birth after one or more complete cycles of in vitro fertilisation: Population based study of linked cycle data from 113 873 women. *BMJ*. 2016; p. i5735.
11. McLernon DJ, Raja EA, Toner JP, Baker VL, Doody KJ, Seifer DB. Predicting personalized cumulative live birth following in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 2022; 117 (2): 326–38.
12. Vaegter KK, Latic TG, Olovsson M, Berglund L, Brodin T, Holte J. Which factors are most predictive for live birth after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) treatments? Analysis of 100 prospectively recorded variables in 8,400 IVF/ICSI single-embryo transfers. *Fertility and Sterility*. 2017; 107 (3): 641–48.
13. Ottosen LDM, Kesmodel U, Hindkjaer J, Ingerslev HJ. Pregnancy prediction models and eSET criteria for IVF patients—do we need more information? *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2007; 24 (1): 29–36.
14. Xu T, d. F. Veiga A, Hammer KC, Paschalidis ICh, Mahalingaiah Sh. Informative predictors of pregnancy after first IVF cycle using eIVF practice highway electronic health records. *Scientific Reports*. 2022; 12: 1–9.
15. C N Barreto N, Castro GZ, Pereira RG, Pereira FAN, Reis FM, Junior WM, et al. Predicting in vitro fertilization success in the Brazilian public health system: a machine learning approach. *Med Biol Eng Comput*. 2022; 60 (7): 1851–61. DOI: 10.1007/s11517-022-02569-1. Epub 2022 May 4. PMID: 35508786.
16. Barnett-Itzhaki Z, Elbaz M, Butterman R, Amar D, Amitay M, Racowsky C, et al. Machine learning vs. classic statistics for the prediction of IVF outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020; 37: 2405–12.
17. Lundberg S, Lee S-I. A unified approach to interpreting model predictions. Available from: <https://arxiv.org/abs/1705.07874>, may 22 2017.
18. Morris JA, Gardner MJ. Statistics in Medicine: Calculating confidence intervals for relative risks (odds ratios) and standardised ratios and rates. *BMJ*. 1988; 296: 1313–6.
19. Sheskin DJ. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. Chapman and Hall/CRC, 2003.
20. Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. Classification and regression trees. Routledge, 2017.
21. Cournapeau D, Brucher M, Perrot M, Duchesnay E. Scikit-learn: Machine learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*. 2011; 12: 2825–30.
22. Prokhorenkova L, Gusev G, Vorobev A, Dorogush AV, Gulina A. Catboost: Unbiased boosting with categorical features. 2017. Available from: <https://arxiv.org/abs/1706.09516>.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕПЛООВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ФЕМТОСЕКУНДНЫХ ЛАЗЕРНЫХ ИМПУЛЬСОВ НА ЭМБРИОНЫ МЫШИ В РАМКАХ ПРОЦЕДУРЫ ВСПОМОГАТЕЛЬНОГО ХЕТЧИНГА

М. В. Кубекина<sup>1,2</sup>✉, М. А. Филатов<sup>1,2</sup>, Ю. Ю. Силаева<sup>1,2</sup>, Д. С. Ситников<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Объединенный институт высоких температур Российской академии наук, Москва, Россия

Одной из причин бесплодия является нарушение хетчинга — процесса вылупления эмбриона из специальной защитной оболочки (ZP, *zona pellucida*), непосредственно перед имплантацией. Часто нарушение хетчинга обусловлено уплотнением или утолщением ZP. Для преодоления бесплодия в таких случаях прибегают к процедуре вспомогательного лазерного хетчинга, когда с помощью лазера в ZP делают отверстие, облегчая выход эмбриона из нее. Вопрос безопасности применения лазера для проведения процедуры вспомогательного хетчинга остается открытым, поскольку лазерное излучение способно нагревать окружающую среду и потенциально вызывать у эмбрионов термический шок. Целью настоящей работы было оценить безопасность фемтосекундного лазерного воздействия на эмбрионы мыши в рамках процедуры вспомогательного хетчинга, используя методы исследования жизнеспособности эмбрионов и уровней экспрессии генов HSP. Для диссекции ZP в работе использовали новый тип источника лазерных импульсов фемтосекундной длительности. Энергия указанных импульсов на два порядка ниже энергии миллисекундных лазерных диссекторов, применяемых в клиниках в настоящий момент. Для оценки фемтосекундного лазерного воздействия на эмбрион производили окрашивание эмбрионов домашней мыши (*Mus musculus*) флуоресцентными красителями, а также оценивали уровни экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока: *Hsp90aa1* и *Hspa5*. После выполнения процедуры вспомогательного лазерного хетчинга с использованием фемтосекундного лазера клетки эмбрионов сохраняли жизнеспособность, а уровни экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока, повышались незначительно по сравнению с группой отрицательного контроля ( $p = 0,408$ ).

**Ключевые слова:** эмбрион, мышь, бластоциста, блестящая оболочка, *zona pellucida*, вспомогательный лазерный хетчинг, фемтосекундные лазерные импульсы, белки теплового шока

**Финансирование:** работы по проведению манипуляций с эмбрионами при помощи лазера и оценка уровней экспрессии генов, ответственных за синтез белков теплового шока, выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 23-19-00424 на оборудовании УНУ «Лазерный тераваттный фемтосекундный комплекс», входящей в состав ЦКП «Лазерный фемтосекундный комплекс» ОИВТ РАН. Работы по получению эмбрионов были выполнены при финансовой поддержке гранта номер 075-15-2021-668 (от 29.07.2021) УНУ Трансгенбанк.

**Вклад авторов:** М. В. Кубекина — проведение иммунофлуоресцентного окрашивания и определение уровня экспрессии белков теплового шока, написание статьи; М. А. Филатов — работа с эмбрионами, статистические методы обработки, написание статьи; Ю. Ю. Силаева — общее руководство экспериментом; Д. С. Ситников — проведение лазерной микрохирургии, обработка результатов, написание статьи; все авторы — обсуждение и редактирование статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ИБГ РАН (протокол № 1 от 25 сентября 2023 г.) и проведено в строгом соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

✉ Для корреспонденции: Марина Владиславовна Кубекина  
ул. Вавилова, д. 34/5, 119334, г. Москва, Россия; marykumy@gmail.com

Статья получена: 07.11.2023 Статья принята к печати: 07.12.2023 Опубликовано онлайн: 26.12.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.046

## EXPLORATION OF THE FEMTOSECOND LASER PULSE THERMAL EFFECTS ON THE MOUSE EMBRYOS DURING THE ASSISTED HATCHING PROCEDURE

Kubekina MV<sup>1,2</sup>✉, Filatov MA<sup>1,2</sup>, Silaeva YuYu<sup>1,2</sup>, Sitnikov DS<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Impaired hatching of the embryo from the *zona pellucida* (ZP), the specialized protective shell, immediately before implantation is one of the factors of infertility. Hatching impairment is often due to the ZP hardening or thickening. In such cases, the laser assisted hatching procedure is used to overcome infertility. During this procedure a hole is drilled in the ZP facilitating the embryo release. The question of the safe use of laser for assisted hatching remains open, since laser beam can heat the environment and cause thermal shock in embryos. The study was aimed to assess safety of the mouse embryo femtosecond laser exposure during the assisted hatching procedure using the embryo viability and HSP gene expression assessment methods. A new type of pulsed laser was used in the study for the ZP dissection — the femtosecond laser. The energy of such pulses was two orders of magnitude lower than the energy of laser dissectors currently used in the clinics. To assess the femtosecond laser exposure to the embryo, the house mouse (*Mus musculus*) embryos were stained with fluorescence dyes, and expression of the genes encoding heat shock proteins (*Hsp90aa1* and *Hspa5*) was assessed. The embryonic cells remained viable after the laser assisted hatching procedure involving the use of a femtosecond laser, while expression levels of the genes encoding heat shock proteins were slightly increased compared to the negative control group ( $p = 0.408$ ).

**Keywords:** embryo, mouse, blastocyst, *zona pellucida*, laser assisted hatching, femtosecond laser pulses, heat shock proteins

**Funding:** the procedures involving manipulating embryos using a laser and assessment of expression of the genes responsible for synthesis of heat shock proteins were supported by RSF (project 23-19-00424) and conducted using the equipment of the UNU "Laser Terawatt Femtosecond Complex", which was a part of the Center for Collective Usage "Laser Femtosecond Complex" of the Joint Institute for High Temperatures RAS. The procedures to acquire embryos were supported by the UNU "Transgenbank" grant (№ 075-15-2021-668 of July 29, 2021).

**Author contribution:** Kubekina MV — immunofluorescence staining and assessment of the heat shock protein expression levels, manuscript writing; Filatov MA — handling embryos, statistical processing, manuscript writing; Silaeva YuYu — general management of the experiment; Sitnikov DS — laser microsurgery, data processing, manuscript writing; all authors — discussion and manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Gene Biology RAS (protocol № 1 dated 25 September 2023) and conducted in strict compliance with the provisions of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

✉ Correspondence should be addressed: Marina V. Kubekina  
Vavilova, 34/5, 119334, Moscow, Russia; marykumy@gmail.com

Received: 07.11.2023 Accepted: 07.12.2023 Published online: 26.12.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.046

Проблема бесплодия затрагивает миллионы людей [1]. Его причины чрезвычайно многообразны и для лечения применяют методы вспомогательных репродуктивных технологий, в том числе проведение процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и культивирования эмбрионов *in vitro*, т. е. вне тела матери. Снаружи предимплантационные эмбрионы млекопитающих (и человека в том числе) покрыты особой защитной оболочкой — блестящей оболочкой (ZP, *zona pellucida*). Она образована гликопротеинами, которые образуют пористую структуру [2, 3]. Благодаря наличию очень маленьких пор (диаметром лишь в несколько десятков нанометров) блестящая оболочка обеспечивает доступ к эмбриону питательных веществ из окружающей его среды, но препятствует проникновению в эмбрион вирусов и бактерий, т. е. выполняет защитную функцию. По мере своего развития эмбрион проходит ряд стадий: дробление, образование морулы, образование бластоцисты. При достижении стадии бластоцисты эмбрион должен покинуть блестящую оболочку. Процесс выхода эмбриона из блестящей оболочки называют хетчингом (от англ. *hatch* — вылупляться). После хетчинга в норме происходит имплантация эмбриона, т. е. его прикрепление к стенке матки. В случае нарушения хетчинга эмбрион не сможет покинуть блестящую оболочку и имплантироваться. Бесплодие вследствие нарушения процесса имплантации — очень распространенное явление. Причины, которые обуславливают нарушение процесса хетчинга, различны: блестящая оболочка слишком толстая или слишком твердая, или клетки эмбриона вырабатывают недостаточное количество ферментов, необходимых для локального разрушения блестящей оболочки. В таких случаях прибегают к проведению процедуры вспомогательного хетчинга, при которой в блестящей оболочке делают отверстие, что облегчает хетчинг эмбриона.

Существуют различные способы осуществления вспомогательного хетчинга: химический, механический и лазерный. При использовании химического метода блестящую оболочку обрабатывают специфическими химическими агентами, разрушающими блестящую оболочку, например, кислым раствором Тироде [4] или ферментами, например, проназой [5]. Однако данная обработка может повлиять непосредственно и на сами клетки эмбриона, что может привести к снижению его способности нормально развиваться дальше. При механическом хетчинге отверстие в блестящей оболочке выполняют с помощью специальной микроиглы [6, 7], однако в процессе данной манипуляции с высокой долей вероятности можно повредить и клетки эмбриона, что тоже негативно скажется на его развитии. Во многих клиниках ЭКО наиболее популярен вспомогательный лазерный хетчинг (ВЛХ) [8, 9]. В этом случае отверстие в блестящей оболочке выполняют с помощью миллисекундных лазерных диссекторов. Они позволяют формировать в блестящей оболочке отверстие размером 5–10 мкм, достаточное как для истончения оболочки, так и для ее диссекции на всю глубину. Разрушение ZP происходит за счет нагрева среды до температуры в несколько сотен градусов [10]. Негативные последствия применения миллисекундных (мс) диссекторов заключаются в нагреве окружающей среды вокруг области воздействия, что может привести к повреждению клеток эмбриона. Так, при использовании диссектора Zylos-tk (Hamilton Thorne; США) с длительностью импульса 0,5 мс и мощностью

300 мВт) тепло за время действия импульса успевает распространиться на расстояние около 16 мкм от центра лазерного пучка и привести к увеличению температуры до 60 °С [11]. Диссекцию блестящей оболочки эмбриона по указанной причине рекомендуется выполнять на ранней стадии развития, когда перивителлиновое пространство достаточно велико (более 15 мкм).

Наиболее перспективными в использовании представляются фемтосекундные (фс) лазеры, позволяющие достичь высокой интенсивности излучения при малой энергии лазерных импульсов. В результате лазерного воздействия фс-длительности происходит нагрев среды в области фокусировки излучения, а в силу короткой длительности импульса тепло не успевает распространиться в стороны. Теоретические оценки показали, что размер области нагрева сопоставим с размером пятна сфокусированного лазерного пучка [12], а максимальный нагрев водной среды при интенсивности лазерных импульсов 1,8–5 ТВт/см<sup>2</sup> на длине волны излучения 514 нм соответствует диапазону значений 5–30 °С [13]. В предыдущих работах для микрохирургии эмбрионов было использовано излучение на указанной длине волны с интенсивностью ~2,5 ТВт/см<sup>2</sup> [14]. В настоящей работе интенсивность в фокусе лазерного луча составляет 3 ТВт/см<sup>2</sup>. Для оценки безопасности использования лазерного излучения фс-длительности для вспомогательного хетчинга на эмбрионах мыши нами были проведены эксперименты по изучению жизнеспособности эмбрионов после лазерной микрохирургии ZP в рамках процедуры ВЛХ. Кроме того, были проведены эксперименты по оценке уровней экспрессии генов, ответственных за синтез белков теплового шока (HSP, heat shock protein), которые начинают вырабатываться в клетках, в частности, при повышении температуры. HSP необходимы для поддержания нативной пространственной структуры белков, которое приобретает особую важность в условиях теплового стресса. У эукариот белки теплового шока семейств Hsp70 и Hsp90 наиболее сильно активируются тепловым стрессом, поэтому представители именно этих семейств выбраны для настоящего исследования [15].

Таким образом, целью настоящей работы было оценить безопасность фемтосекундного лазерного воздействия на эмбрионы мыши в рамках процедуры вспомогательного хетчинга, используя методы исследования жизнеспособности эмбрионов и уровней экспрессии генов HSP.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Экспериментальная установка

Эксперименты по микрохирургии эмбрионов выполняли на установке «Фемтосекундный лазерный скальпель» (ОИВТ РАН, Россия) [16]. Для создания лазерного скальпеля использовали излучение фс-лазера ТЕТА (Авеста, Троицк, Россия). Лазерные импульсы на выходе из источника имели следующие параметры: длительность импульса  $\tau$  — 280 фс, энергия — 330 мкДж, длина волны излучения  $\lambda$  — 1028 нм, частота следования импульсов — 2,5 кГц. На пути излучения был установлен кристалл KDP (дигидроортофосфат калия,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), осуществляющий преобразование инфракрасного излучения в видимое; из кристалла выходило излучение на длине волны  $\lambda$ , равной 514 нм. Далее оно заводилось в правый боковой порт инвертированного микроскопа Olympus IX-71 и

фокусировалось микрообъективом 20xUPlanFL (Olympus; Япония) с числовой апертурой NA, равной 0,5 в пятно радиусом  $r = 1,4$  мкм по уровню  $1/e$ . Узел ослабления, установленный после лазерного источника (рис. 1), служил для регулировки энергии импульсов. Узел телескопа был предназначен для согласования диаметра лазерного пучка со световой апертурой микрообъектива и избегания потери энергии при диафрагмировании на оправе линз микрообъектива. Для контроля энергии лазерных импульсов использовали фотодиод DET36A2 (Thorlabs Inc.; США), на который ответвляли часть лазерного пучка при помощи тонкой стеклянной пластинки (отражение Френеля). Сигнал с фотодиода оцифровывали с помощью осциллографа Tektronix TDS 5054. Калибровку амплитуды сигнала фотодиода выполняли с помощью измерителя мощности, состоящего из фотодиодного детектора S120VC и консоли PM100D (Thorlabs Inc.; США). Детектор временно устанавливали на предметный столик микроскопа SCAN IM 120×80 (Märzhäuser Wetzlar; Германия) и регистрировали лазерное излучение на выходе микрообъектива.

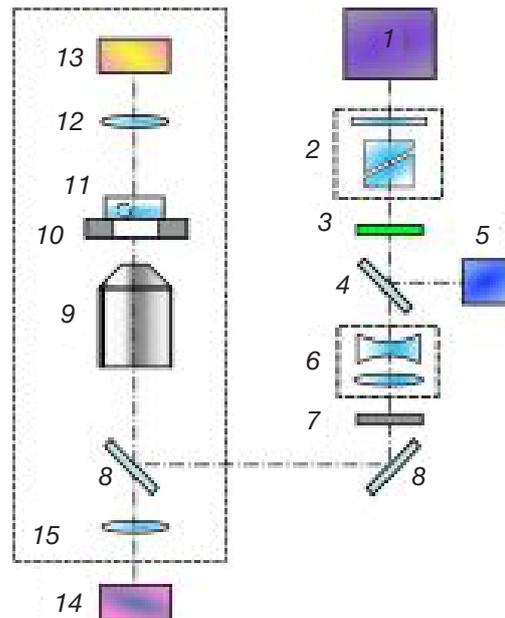
Для проведения микрохирургии эмбрионы рассаживали в чашки Петри со стеклянным дном толщиной 170 мкм (излучение фокусировалось сквозь дно чашки). Чашку Петри устанавливали на моторизованном предметном столике микроскопа (Märzhäuser Wetzlar, Германия) для перемещения эмбриона относительно неподвижного лазерного луча. Изображение эмбриона регистрировали КМОП-камерой DFK 72AUC02 (The Imaging Source; Германия) и выводили на экран персонального компьютера. Для автоматизации процедуры микрохирургии использовали программное обеспечение, написанное в среде LabView (National Instruments, США). Оно позволяло оператору осуществлять управление следующими параметрами: энергия, частота следования импульсов и расходимость лазерного излучения, а также задавать траекторию движения лазерного луча, рисуя прямо поверх изображения эмбриона. Диссекцию ZP осуществляли последовательностью лазерных импульсов при скорости перемещения эмбриона относительно луча 0,01 мм/с.

### Содержание животных

В настоящей работе использовали мышей гибридов первого поколения CBA × C57Bl/6J. Животных содержали при световом режиме — 14 ч света и 10 ч темноты и температуре, поддерживаемой в диапазоне 22–24 °С. Воду и питание (специализированный экструдированный комбикорм для разведения мышей) животные получали *ad libitum*. Все манипуляции с животными производили в соответствии с рекомендациями Комиссии по биоэтике Института биологии гена РАН.

### Манипуляции с ранними эмбрионами

Большое число зигот получали с помощью общеизвестного протокола стимуляции овуляции с применением фолликулостимулирующего гормона и хорионического гонадотропина [17]. 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.



**Рис. 1.** Схема фемтосекундного лазерного скальпеля. 1 — фс-лазер, 2 — узел ослабления, 3 — кристалл ГВГ, 4 — стеклянная пластинка, 5 — фотодиод, 6 — узел телескопа, 7 — механический прерыватель лазерного излучения, 8 — зеркала на длину волны лазерного излучения, 9 — микрообъектив, 10 — моторизованный предметный столик, 11 — чашка Петри с эмбрионами, 12 — конденсор микроскопа, 13 — осветитель, 14 — видеокамера, 15 — инвертированный микроскоп

Факт спаривания определяли утром следующего дня по наличию вагинальной пробки.

### Получение эмбрионов

Выделение эмбрионов производили на стадии зиготы (0,5 дня эмбрионального развития, E0,5), после чего осуществляли их культивирование *in vitro*. Для получения эмбрионов самок умерщвляли путем дислокации шейных позвонков. Выделенные яйцеводы помещали в среду Ооклин («ПанЭко»; Россия), где отсепарировали жировую ткань с помощью игл от шприцов и пинцетов. Очищенные яйцеводы переносили в чистую каплю среды Ооклин объемом 100 мкл, где вскрывали ампулярную часть яйцевода, что позволяло получить зиготы, окруженные клетками кумулюса. Затем в данную каплю вносили примерно 0,03 г гиалуронидазы (препарат лидаза, Микроген, Россия) для очистки зигот от клеток кумулюса. Полученные зиготы последовательно отмывали в четырех каплях среды Ооклин, после чего переносили в среду для культивирования.

### Культивирование эмбрионов

Культивирование эмбрионов до стадии морулы (E2,5) осуществляли в четырехлуночных планшетах (Termo Scientific Nunc, США), использовали среду для культивирования гамет и эмбрионов (Fujifilm Irvine Scientific, США). От стадии морулы до стадии бластоцисты (E3,5) эмбрионы культивировали в покрытых минеральным маслом (Origio; Дания) каплях среды объемом 20 мкл по 2–3 эмбриона в капле.

### Транспортировка эмбрионов

Получение эмбрионов и их культивирование до стадии морулы осуществляли на базе ИБГ РАН, тогда как

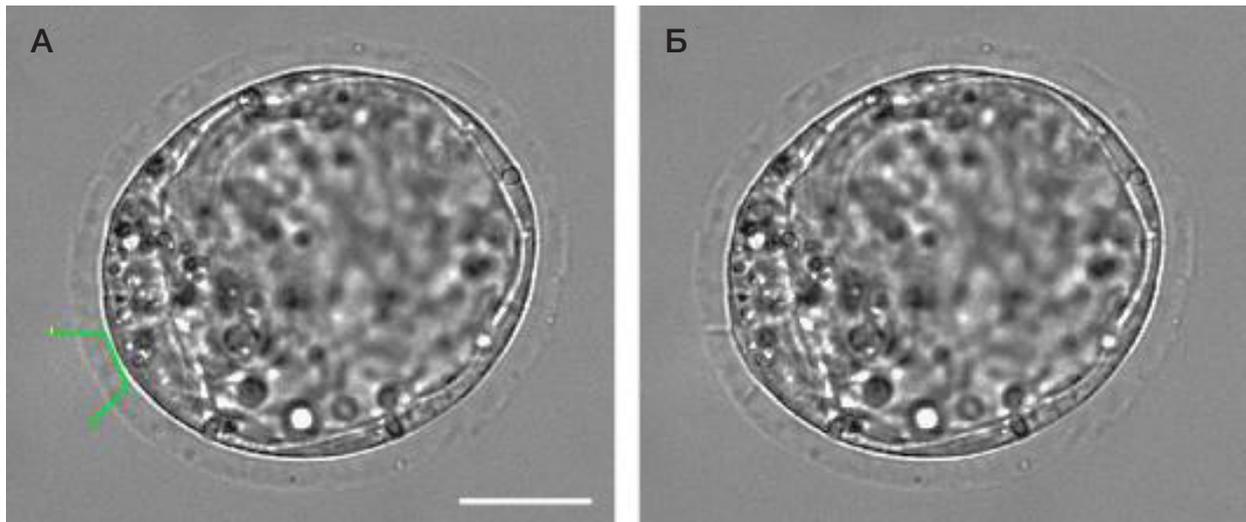


Рис. 2. Фотографии эмбриона до проведения микрохирургии оболочки (А) и после (Б). Масштабный отрезок — 20 мкм

культивирование эмбрионов до стадии бластоцисты и процедуру ВЛХ выполняли на базе ОИВТ РАН. Для транспортировки эмбрионы помещали в эппендорф объемом 0,5 мл, заполненный средой, основанной на буфере HEPES (Ооклин, «Панэко», Россия). Для поддержания постоянной температуры при перевозке эмбрионов эппендорф с эмбрионами помещали в термос с водой, заранее нагретой до 37 °С. Транспортировку эмбрионов осуществляли в течение 90 мин.

### Группы эмбрионов

В исследовании эмбрионы были разделены на четыре группы: отрицательный (1) и положительный (2) контроли, нежизнеспособные эмбрионы (3), а также экспериментальная группа (4). В группе нежизнеспособных эмбрионов число эмбрионов составляло 4 шт., в остальных группах по 30 шт.

1. В качестве отрицательного контроля были использованы эмбрионы, культивировавшиеся при стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>/воздух 37 °С) в инкубаторе (Binder; Германия).

2. В качестве положительного контроля были использованы бластоцисты, подвергшиеся тепловому воздействию при 42 °С в течение 30 мин. Тепловое воздействие также осуществляли в углекислотном инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>/воздух 42 °С). В ходе воздействия эмбрионы находились в той же культуральной среде, что и интактные эмбрионы, а также в такой же культуральной посуде (четырёхлуночных планшетах). Далее бластоцисты данной группы культивировали при стандартных условиях в течение 2 ч для формирования ответной реакции на тепловое воздействие.

3. Для получения нежизнеспособных эмбрионов осуществляли их обработку фиксирующим раствором (4%-й параформальдегид в фосфатно-солевом буфере (phosphate buffered saline, PBS)), а затем их пермеабелизацию в 0,003% растворе Тритона в PBS.

4. В экспериментальную группу входили эмбрионы, подвергнутые лазерному воздействию в рамках процедуры ВЛХ. Микрохирургию прозрачной оболочки эмбрионов осуществляли на стадии бластоцисты (~Е3,5). За день до эксперимента эмбрионы на стадии морулы рассаживали в подготовленные чашки Петри (кат. № 200350, SPL Lifesciences; Корея) со стеклянным дном (по

три эмбриона в каждую каплю) и переносили в инкубатор. В каждой чашке Петри предварительно создавали по три капли со средой для культивирования объемом ~20 мкл, которые затем покрывали жидким парафиновым маслом для сред ЭКО 1 (кат. № Э0350-160, «ПанЭко»; Россия). В день эксперимента чашку Петри доставали из инкубатора и закрепляли на предметном столике микроскопа. Общее время пребывания эмбрионов вне инкубатора не превышало 10 мин.

### Эксперимент

Для осуществления процедуры ВЛХ оператор наносил поверх изображения эмбриона траекторию движения лазерного луча, задавая форму надреза блестящей оболочки эмбриона (рис. 2А, зеленая ломаная линия). Как и в предыдущем исследовании [16], форма надреза имела U-образную форму — лазерный луч прорезал оболочку на 80–90% ее толщины. Программный комплекс осуществлял процедуру микрохирургии в автоматизированном режиме, перемещая эмбрион по заданной траектории относительно неподвижного луча и управляя моментами включения и выключения лазерного излучения. Энергия лазерных импульсов в эксперименте составляла 30 нДж. Результат микрохирургии показан на рис. 2Б.

### Флуоресцентное окрашивание

Окрашивание групп эмбрионов производили одновременно тремя красителями:

1) Hoechst 33342 (Thermo Scientific; США) — контроль окрашивания, возбуждение/эмиссия 350/461, рабочая концентрация 1 мкг/мл;

2) Propidium Iodide (Thermo Scientific; США) — окрашивание нежизнеспособных клеток возбуждение/эмиссия 493/636, рабочая концентрация 500 нМ;

3) Calcein-AM (Sigma Aldrich; США) — окрашивание живых клеток, возбуждение/эмиссия 494/517, рабочая концентрация 1 мкМ.

Флуоресцентные красители доводили до рабочей концентрации в среде для культивирования гамет и эмбрионов. В такой среде эмбрионы культивировали в течение 30 мин при 37 °С в инкубаторе. После этого эмбрионы отмывали от красителей в трех каплях свежей среды Ооклин («ПанЭко»; Россия), а затем оценивали их

Таблица. Праймеры, использованные в исследовании (последовательности указаны в направлении от 5' к 3')

Название гена	Genbank No	Прямой праймер (5' → 3')	Обратный праймер (5' → 3')	Длина продукта
Hprt	NM_013556.2	CAGCGTCGTGATTAGCGATGA	GCCACAATGTGATGGCCTCC	174
Hsp90aa1	NM_010480.5	TGAGCAGTATGCCTGGGAGT	CGACCCATTGGTTCACCTGT	75
Hspa5	NM_001163434.1	GGAATGACCCTTCGGTGACAG	GTCTTGGTTTGCCACCTCC	109

жизнеспособность на флуоресцентном инвертированном микроскопе Eclipse Ti-E (Nikon; Япония).

### Определение уровня экспрессии генов

Выделение РНК проводили с использованием реактива TRIzol по протоколу фирмы-производителя (Thermo Scientific; США). Обратную транскрипцию для получения комплементарной ДНК (кДНК) проводили набором MMLV RT по протоколу фирмы-производителя («Евроген»; Россия). Определение экспрессии генов проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad; США) с применением готовой смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген»; Россия). Образцы кДНК от бластоцист амплифицировали в трех повторностях с использованием праймеров на референсный ген *Hprt* и гены белков теплового шока *Hsp90aa1* и *Hspa5*. Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров приведены в таблице. Уровень экспрессии генов *Hsp90aa1* и *Hspa5* считали по общеизвестному методу  $\Delta\text{Ct}$  [18].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Определение жизнеспособности эмбрионов путем флуоресцентного окрашивания

Для определения влияния лазерной микрохирургии на жизнеспособность эмбрионов мыши было проведено флуоресцентное окрашивание всех групп эмбрионов (рис. 3).

Эмбрионы после лазерной микрохирургии окрашиваются красителем Calcein-AM, также как группы положительного и отрицательного контроля, при этом красителем Propidium Iodide окрашивается только группа нежизнеспособных эмбрионов. Эти результаты позволяют сделать вывод о сохранении жизнеспособности в экспериментальной группе эмбрионов после лазерной микрохирургии. Небольшая разница в интенсивности окрашивания Calcein-AM и Hoechst 33342 объясняется смещением настроек камеры микроскопа, которые необходимо вручную подбирать при оценке каждой группы эмбрионов.

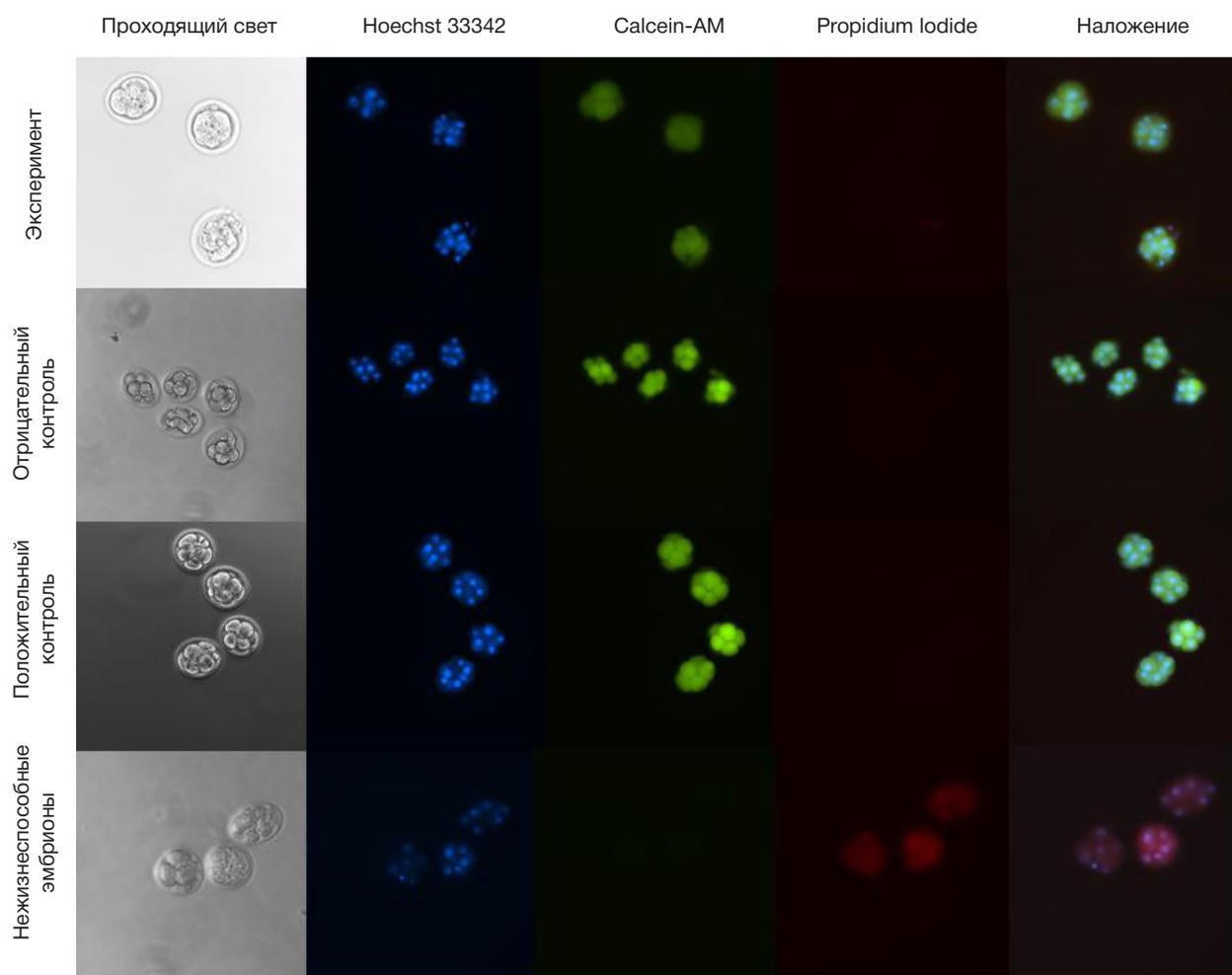


Рис. 3. Флуоресцентное окрашивание эмбрионов разных групп. Жизнеспособные эмбрионы окрашивались красителем Calcein-AM, нежизнеспособные — Propidium Iodide, ядра жизнеспособных и нежизнеспособных эмбрионов — Hoechst 33342

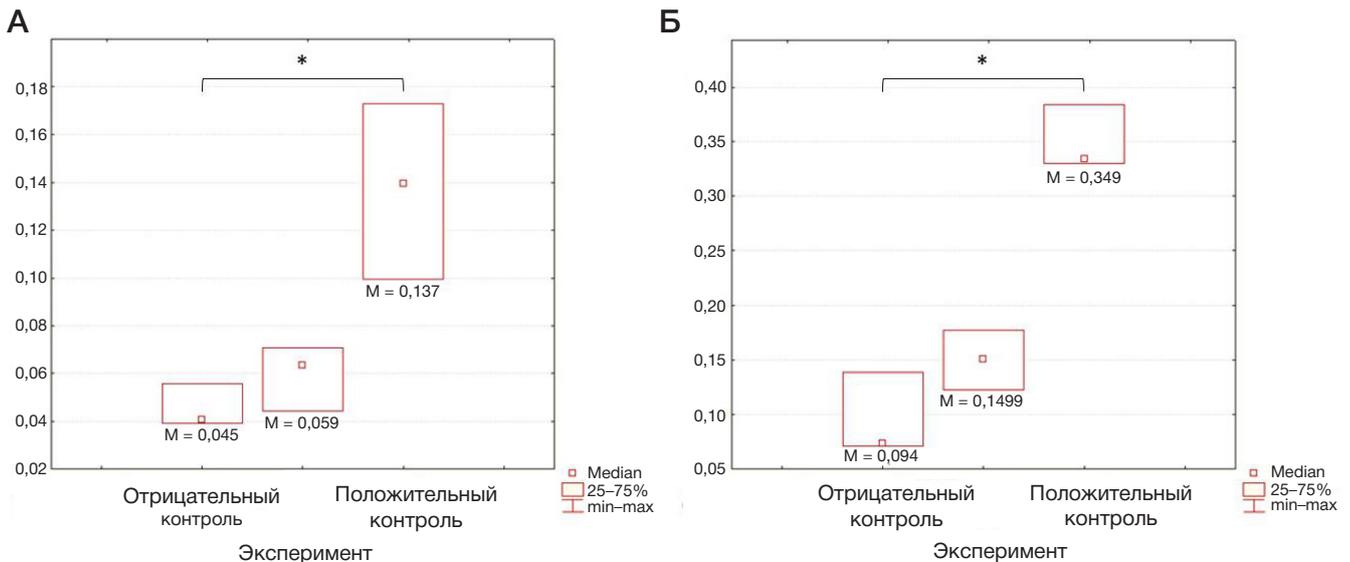


Рис. 4. Графическое изображение уровня экспрессии генов белков теплового шока в группах отрицательного и положительного контроля, а также в экспериментальной группе эмбрионов. Экспрессия генов белков теплового шока *Hsp90aa1* (А) и *Hspa5* (Б)

#### Определение уровня экспрессии генов теплового шока *Hsp90aa1* и *Hspa5*

Известно, что воздействие лазерного импульса на биологический объект сопровождается термическим локальным нагревом [19, 20]. Культивирование эмбрионов при нефизиологичных высоких температурах ( $\geq 39$  °C) способствует росту уровня экспрессии генов белков теплового шока [21]. Усиление экспрессии этих генов является частью клеточного ответа на тепловой шок. Для определения влияния лазерной микрохирургии на экспрессию генов белков теплового шока *Hsp90aa1* (семейство *Hsp90*) и *Hspa5* (семейство *Hsp70*) в эмбрионах было проведено исследование уровня экспрессии этих генов в группах отрицательного и положительного контроля, а также в экспериментальной группе эмбрионов, подвергнутых лазерному воздействию (рис. 4).

В связи с отсутствием нормального распределения среди полученных данных для анализа использовали непараметрический критерий. Сравнение данных проводили с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллеса. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Обнаружены статистически значимые различия между группами отрицательного и положительного контроля ( $p = 0,033$ ) для обоих рассматриваемых генов. Различия между остальными группами не являются статистически значимыми:  $p = 0,408$  при сравнении экспериментальной группы и группы положительного контроля и  $p = 0,890$  при сравнении экспериментальной группы и группы отрицательного контроля при исследовании экспрессии обоих генов *Hsp90aa1* и *Hspa5*.

Уровни экспрессии генов *Hsp90aa1* и *Hspa5* в группах отрицательного и положительного контроля имеют достоверные различия, однако различия между экспериментальной группой и группой отрицательного контроля, а также между экспериментальной группой и группой положительного контроля в величине уровня экспрессии обоих генов недостоверны. Исходя из этого, можно сделать предположение, что лазерная микрохирургия может вызывать незначительное повышение уровня экспрессии генов HSP в бластоцистах мыши.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Температура является ключевым фактором в развитии эмбрионов, и ее влияние в контексте имитации физиологических и биохимических условий половых путей было исследовано в ряде работ [22–24]. Предыдущие исследования подтверждают влияние термического стресса на репродуктивную эффективность как у домашних животных, так и у человека. Повышение температуры влияет на созревание ооцитов и развитие эмбрионов, особенно на ранних стадиях развития до активации генома зиготы. Это делает ооциты и эмбрионы более уязвимыми к тепловому стрессу, что может вызвать нарушения в их развитии. Подобные эффекты были описаны еще несколько десятилетий назад [22–24].

Существуют данные, указывающие на то, что лазерное облучение может оказывать негативные эффекты на живые объекты, например, связанные с термическим воздействием [25, 26]. Вопрос безопасности миллисекундного лазерного воздействия на эмбрионы до сих пор остается открытым. Результаты исследований указывают на определенные риски и негативные последствия этой процедуры [27]. В частности, применение лазерного воздействия для вспомогательного хетчинга на стадии 6–8 клеток привело к значительному снижению количества клеток в эмбрионах. Аналогично, на двухклеточной стадии было обнаружено увеличение фрагментации ДНК на стадии бластоцисты. Авторы исследования выразили беспокойство относительно того, что, несмотря на увеличение частоты хетчинга, повреждения ДНК могут оказать воздействие на потенциал имплантации и последующее развитие эмбрионов. Похожие выводы о негативных последствиях нарушения целостности оболочки на ранних этапах преимплантационного развития были сделаны в работе [28].

Исследование, проведенное еще в 1999 г., показало, что бластоциста, как правило, реагирует на миллисекундные лазерные импульсы, что приводит к ее коллапсу [29]. Восстановление бластоцисты занимает некоторое время, что усложняет прогнозирование сроков хетчинга и может затруднить проведение процедуры биопсии трофобласта. С этой точки зрения применение фемтосекундных лазерных импульсов может быть более эффективным, поскольку микрохирургия оболочки даже

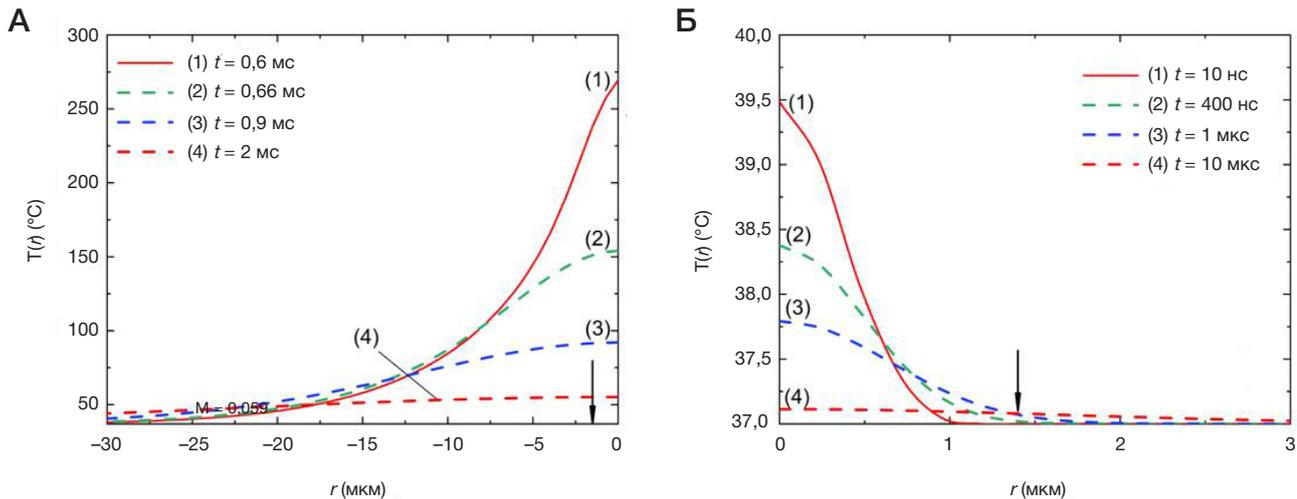


Рис. 5. Радиальные профили температур  $T(r, z = 0)$  в различные моменты времени для импульса (А) миллисекундной и (Б) фемтосекундной длительности. Стрелками отмечен размер лазерного пучка по уровню  $1/e$ . Время  $t$  отсчитывают от начала действия импульса

на поздней стадии развития эмбриона не приводит к коллапсированию бластоцисты и нарушению сроков ее хетчинга. Тем не менее, существующие данные свидетельствуют о том, что и применение фемтосекундных лазеров может представлять опасность для биологических объектов. Так, их воздействие может приводить к гибели стромальных клеток роговицы кролика [30].

Для оценки теплового воздействия, оказываемого лазерными импульсами, ранее было выполнено моделирование результата поглощения импульсов фемтосекундной длительности в сравнении с миллисекундной (рис. 5) [31]. Пространственные распределения температуры для мс ( $\lambda = 1480$  нм,  $\tau = 0.6$  мс,  $P = 180$  мВт) и фс ( $\lambda = 514$  нм,  $\tau = 280$  фс, интенсивность  $I_0 = 2,5 \times 10^{12}$  Вт/см<sup>2</sup>) импульсов представлены как в момент достижения максимальной температуры (сплошная кривая), так и на стадии остывания среды (пунктирные кривые). Параметры воздействия признаны оптимальными для диссекции блестящей оболочки [10, 31]. При фемтосекундном воздействии тепло сосредоточено преимущественно в пределах области фокусировки пучка ( $r < 1,4$  мкм), что создает предпосылки для безопасной микрохирургии эмбриона в рамках ВЛХ. Миллисекундный импульс в то же время способен прогреть существенно более объемную область среды и требует аккуратности для сведения к минимуму риска термического повреждения клеток эмбриона, прилегающих к ЗР, при диссекции последней.

Для оценки безопасности использования фемтосекундного лазера при проведении процедуры ВЛХ, нами были проведены эксперименты по окрашиванию эмбрионов флуоресцентными красителями и по определению уровней экспрессии генов HSP. Показано,

что даже после микрохирургии ЗР эмбрионы сохраняли жизнеспособность (наблюдается окрашивание эмбрионов витальным красителем Calcein-AM).

Для определения теплового шока, которому были подвергнуты эмбрионы в результате лазерного воздействия, были измерены уровни экспрессии генов, кодирующих два ключевых гена белков теплового шока: *Hsp90aa1* и *Hspa5*. Мы обнаружили статистически значимые различия в уровнях экспрессии данных генов между группами положительного и отрицательного контроля, тогда как уровни экспрессии данных генов в экспериментальных группах статистически значимо не отличались от контрольных групп. Полученные результаты демонстрируют хорошее согласие с теоретическими оценками.

## Выводы

Полученные результаты данного пилотного исследования позволяют сделать предположение, что наблюдаемые эффекты могут быть обусловлены локальным действием лазера, и эмбрион в целом сохраняет жизнеспособность. Таким образом, для всесторонней оценки безопасности и эффективности применения процедуры вспомогательного лазерного хетчинга с использованием фс-лазера требуется проведение дополнительных исследовательских работ. Необходимо осуществить экспериментальное сравнение фемтосекундного лазера и широко используемых в клинической практике инфракрасных лазеров в контексте их влияния на экспрессию белков теплового шока, а также оценить воздействие фемтосекундного лазера на эмбрионы мыши *in vivo*, выполнив их пересадку сурrogатным матерям.

## Литература

- Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. Hum Reprod Update. 2015; 21 (4): 411–26. DOI: 10.1093/humupd/dmv016. Epub 2015 Mar 22. PMID: 25801630.
- Krivosogova AS, Bruter AV, Makutina VA, Okulova YD, Ilchuk LA, Kubekina MV, et al. AAV infection of bovine embryos: Novel, simple and effective tool for genome editing. Theriogenology. 2022; 193: 77–86. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.09.007.
- Báez F, Camargo AA, Gastal GDA. Ultrastructural Imaging Analysis of the Zona Pellucida Surface in Bovine Oocytes. Microsc Microanal. 2019; 25 (4): 1032–6. DOI: 10.1017/S1431927619000692. Epub 2019 May 28. PMID: 31134876.
- An L, Liu Y, Li M, Liu Z, Wang Z, Dai Y, et al. Site specificity of blastocyst hatching significantly influences pregnancy outcomes in mice. FASEB J. 2021; 35 (9): e21812. DOI: 10.1096/fj.202100653R. PMID: 34411354.

5. Nishio E, Moriwaki T, Yoshii K, Udagawa Y. Chemical removal of zona pellucida versus laser assisted hatching after repeated failures of assisted reproductive technology. *Reprod Med Biol.* 2006; 5 (4): 263–7. DOI: 10.1111/j.1447-0578.2006.00151.x.
6. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Ali KR. Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28 (2): 119–28. DOI: 10.1007/s10815-010-9495-3. Epub 2010 Nov 2. PMID: 21042844; PMCID: PMC3059528.
7. Makrakis E, Angeli I, Agapitou K, Pappas K, Dafereras A, Pantos K. Laser versus mechanical assisted hatching: a prospective study of clinical outcomes. *Fertil Steril.* 2006; 86 (6): 1596–600. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.05.031. Epub 2006 Oct 20. PMID: 17055494.
8. Wang Y, Chen C, Liang J, Fan L, Liu D, Zhang X, et al. A comparison of the clinical effects of thinning and drilling on laser-assisted hatching. *Lasers Med Sci.* 2022; 37 (1): 1–9. DOI: 10.1007/s10103-020-03230-9.
9. Xu W, Zhang L, Zhang L, Jin Z, Wu L, Li S, Shu J. Laser-assisted hatching in lower grade cleavage stage embryos improves blastocyst formation: results from a retrospective study. *J Ovarian Res.* 2021; 14 (1): 94. DOI: 10.1186/s13048-021-00844-7.
10. 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.
11. Douglas-Hamilton DH, Conia J. Thermal effects in laser-assisted pre-embryo zona drilling. *J Biomed Opt.* 2001; 6 (2): 205.
12. Vogel A, Noack J, Hüttman G, Paltauf G. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Appl Phys B.* 2005; 81 (8): 1015–47. DOI: 10.1007/s00340-005-2036-6.
13. Liang X-X, Zhang Z, Vogel A. Multi-rate-equation modeling of the energy spectrum of laser-induced conduction band electrons in water. *Opt Express.* 2019; 27 (4): 4672. DOI: 10.1364/oe.27.004672.
14. 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.
15. Hahn A, Bublak D, Schleiff E, Scharf KD. Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato. *Plant Cell.* 2011; 23 (2): 741–55. DOI: 10.1105/tpc.110.076018.
16. Ситников Д. С., Ильина И. В., Филатов М. А., Силаева Ю. Ю. Исследование влияния микродиссекции блестящей оболочки эмбрионов млекопитающих на ее толщину. *Вестник РГМУ.* 2023; 1: 41–8. DOI: 10.24075/vrgmu.2023.002.
17. Филатов М. А., Окулова Ю. Д., Шафеев Р. А., Коршунова Д. С., Силаева Ю. Ю. Криоконсервация как подход к сохранению уникальных линий генетически модифицированных животных. *Биотехнология.* 2022; 38 (6): 64–72. DOI: 10.56304/S0234275822060072.
18. Кубекина, М. В., Калинина, А. А., Коршунова, Д. С., Брутер, А. В., Силаева, Ю. Ю. Модели митохондриальной дисфункции с индуцируемой экспрессией мутантного варианта гена Polg. *Вестник РГМУ.* 2022; 2: 12–19. DOI: 10.24075/vrgmu.2022.021.
19. Sajjadi AY, Mitra K, Grace M. Expression of heat shock proteins 70 and 47 in tissues following short-pulse laser irradiation: assessment of thermal damage and healing. *Med Eng Phys.* 2013; 35 (10): 1406–14. DOI: 10.1016/j.medengphy.2013.03.011.
20. Capon A, Mordon S. Can thermal lasers promote skin wound healing? *Am J Clin Dermatol.* 2003; 4 (1): 1–12. DOI: 10.2165/00128071-200304010-00001. PMID: 12477368.
21. Choi I, Dasari A, Kim NH, Campbell KH. Effects of prolonged exposure of mouse embryos to elevated temperatures on embryonic developmental competence. *Reprod Biomed Online.* 2015; 31 (2): 171–9. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.04.017.
22. Monty DE, Jr, Racowsky C. In vitro evaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows. *Theriogenology.* 1987; 28 (4): 451–65. DOI: 10.1016/0093-691x(87)90250-0. PMID: 16726328.
23. Edwards JL, Ealy AD, Hansen PJ. Regulation of heat shock protein 70 synthesis by heat shock in the preimplantation murine embryo. *Theriogenology.* 1995; 44 (3): 329–37. DOI: 10.1016/0093-691x(95)00188-e. PMID: 16727733.
24. Edwards JL, Hansen PJ. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev.* 1997; 46 (2): 138–45. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199702)46:2<138::AID-MRD4>3.0.CO;2-R. PMID: 9021745.
25. Douglas-Hamilton DH, Conia J. Thermal effects in laser-assisted pre-embryo zona drilling. *Journal of Biomedical Optics.* 2001; 6 (2): 205. DOI: 10.1117/1.1353796.
26. Tucker M, Ball, G. Assisted hatching as a technique for use in human in vitro fertilization and embryo transfer is long overdue for careful and appropriate study. *The Journal of Clinical Embryology.* 2009; 12 (1): 9–14.
27. Honguntikar SD, Uppangala S, Saliyan SR, Kalthur G, Kumar P, Adiga SK. Laser-assisted hatching of cleavage-stage embryos impairs developmental potential and increases DNA damage in blastocysts. *Lasers Med Sci.* 2015; 30 (1): 95–101. DOI: 10.1007/s10103-014-1625-1. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24989334.
28. Sanmee U, Piromlertamorn W, Vutyavanich T. The effect of the site of laser zona opening on the complete hatching of mouse blastocysts and their cell numbers. *Clin Exp Reprod Med.* 2016; 43 (3): 152–6. DOI: 10.5653/cepm.2016.43.3.152. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27689037; PMCID: PMC5039307.
29. Montag M, van der Ven H. Laser-assisted hatching in assisted reproduction. *Croat Med J.* 1999; 40 (3): 398–403. PMID: 10411968.
30. de Medeiros FW, Kaur H, Agrawal V, Chaurasia SS, Hammel J, et al. Effect of femtosecond laser energy level on corneal stromal cell death and inflammation. *J Refract Surg.* 2009; 25 (10): 869–74. DOI: 10.3928/1081597X-20090917-08.
31. 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 (5): 482–90. DOI: 10.1070/QEL18047.

## References

1. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update.* 2015; 21 (4): 411–26. DOI: 10.1093/humupd/dmv016. Epub 2015 Mar 22. PMID: 25801630.
2. Krivonogova AS, Bruter AV, Makutina VA, Okulova YD, Ilchuk LA, Kubekina MV, et al. AAV infection of bovine embryos: Novel, simple and effective tool for genome editing. *Theriogenology.* 2022; 193: 77–86. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.09.007.
3. Báez F, Camargo ÁA, Gastal GDA. Ultrastructural Imaging Analysis of the Zona Pellucida Surface in Bovine Oocytes. *Microsc Microanal.* 2019; 25 (4): 1032–6. DOI: 10.1017/S1431927619000692. Epub 2019 May 28. PMID: 31134876.
4. An L, Liu Y, Li M, Liu Z, Wang Z, Dai Y, et al. Site specificity of blastocyst hatching significantly influences pregnancy outcomes in mice. *FASEB J.* 2021; 35 (9): e21812. DOI: 10.1096/fj.202100653R. PMID: 34411354.
5. Nishio E, Moriwaki T, Yoshii K, Udagawa Y. Chemical removal of zona pellucida versus laser assisted hatching after repeated failures of assisted reproductive technology. *Reprod Med Biol.* 2006; 5 (4): 263–7. DOI: 10.1111/j.1447-0578.2006.00151.x.
6. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Ali KR. Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28 (2): 119–28. DOI: 10.1007/s10815-010-9495-3. Epub 2010 Nov 2. PMID: 21042844; PMCID: PMC3059528.
7. Makrakis E, Angeli I, Agapitou K, Pappas K, Dafereras A, Pantos K. Laser versus mechanical assisted hatching: a prospective study of clinical outcomes. *Fertil Steril.* 2006; 86 (6): 1596–600. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.05.031. Epub 2006 Oct 20. PMID: 17055494.
8. Wang Y, Chen C, Liang J, Fan L, Liu D, Zhang X, et al. A

- comparison of the clinical effects of thinning and drilling on laser-assisted hatching. *Lasers Med Sci.* 2022; 37 (1): 1–9. DOI: 10.1007/s10103-020-03230-9.
9. Xu W, Zhang L, Zhang L, Jin Z, Wu L, Li S, Shu J. Laser-assisted hatching in lower grade cleavage stage embryos improves blastocyst formation: results from a retrospective study. *J Ovarian Res.* 2021; 14 (1): 94. DOI: 10.1186/s13048-021-00844-7.
  10. 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.
  11. Douglas-Hamilton DH, Conia J. Thermal effects in laser-assisted pre-embryo zona drilling. *J Biomed Opt.* 2001; 6 (2): 205.
  12. Vogel A, Noack J, Hüttman G, Paltauf G. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Appl Phys B.* 2005; 81 (8): 1015–47. DOI: 10.1007/s00340-005-2036-6.
  13. Liang X-X, Zhang Z, Vogel A. Multi-rate-equation modeling of the energy spectrum of laser-induced conduction band electrons in water. *Opt Express.* 2019; 27 (4): 4672. DOI: 10.1364/oe.27.004672.
  14. 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.
  15. Hahn A, Bublak D, Schleiff E, Scharf KD. Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato. *Plant Cell.* 2011; 23 (2): 741–55. DOI: 10.1105/tpc.110.076018.
  16. Sitnikov DS, Ilina IV, Filatov MA, Silaeva YY. Assessment of the zona pellucida microdissection on its thickness in mammalian embryos. *Bulletin of RSMU.* 2023; 1: 38–44. DOI: 10.24075/brsmu.2023.002.
  17. Filatov MA, Okulova JuD, Shafei RA, Korshunova DS, Silaeva JuJu. Kriokonservacija kak podhod k sohraneniju unikal'nyh linij geneticheski modifitsirovannyh zhivotnyh. *Biotehnologija.* 2022; 38 (6): 64–72. DOI: 10.56304/S0234275822060072. Russian.
  18. Kubekina MV, Kalinina AA, Korshunova DS, Bruter AV, Silaeva YY. Models of mitochondrial dysfunction with inducible expression of Polg pathogenic mutant variant. *Bulletin of RSMU.* 2022. № 2. P. 11–7. DOI: 10.24075/brsmu.2022.021.
  19. Sajjadi AY, Mitra K, Grace M. Expression of heat shock proteins 70 and 47 in tissues following short-pulse laser irradiation: assessment of thermal damage and healing. *Med Eng Phys.* 2013; 35 (10): 1406–14. DOI: 10.1016/j.medengphys.2013.03.011.
  20. Capon A, Mordon S. Can thermal lasers promote skin wound healing? *Am J Clin Dermatol.* 2003; 4 (1): 1–12. DOI: 10.2165/00128071-200304010-00001. PMID: 12477368.
  21. Choi I, Dasari A, Kim NH, Campbell KH. Effects of prolonged exposure of mouse embryos to elevated temperatures on embryonic developmental competence. *Reprod Biomed Online.* 2015; 31 (2): 171–9. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.04.017.
  22. Monty DE, Jr, Racowsky C. In vitro evaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows. *Theriogenology.* 1987; 28 (4): 451–65. DOI: 10.1016/0093-691x(87)90250-0. PMID: 16726328.
  23. Edwards JL, Ealy AD, Hansen PJ. Regulation of heat shock protein 70 synthesis by heat shock in the preimplantation murine embryo. *Theriogenology.* 1995; 44 (3): 329–37. DOI: 10.1016/0093-691x(95)00188-e. PMID: 16727733.
  24. Edwards JL, Hansen PJ. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev.* 1997; 46 (2): 138–45. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199702)46:2<138::AID-MRD4>3.0.CO;2-R. PMID: 9021745.
  25. Douglas-Hamilton DH, Conia, J. Thermal effects in laser-assisted pre-embryo zona drilling. *Journal of Biomedical Optics.* 2001; 6 (2): 205. DOI: 10.1117/1.1353796.
  26. Tucker M, Ball, G. Assisted hatching as a technique for use in human in vitro fertilization and embryo transfer is long overdue for careful and appropriate study. *The Journal of Clinical Embryology.* 2009; 12 (1): 9–14.
  27. Honguntikar SD, Uppangala S, Salian SR, Kalthur G, Kumar P, Adiga SK. Laser-assisted hatching of cleavage-stage embryos impairs developmental potential and increases DNA damage in blastocysts. *Lasers Med Sci.* 2015; 30 (1): 95–101. DOI: 10.1007/s10103-014-1625-1. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24989334.
  28. Sanmee U, Piromlertamorn W, Vutyavanich T. The effect of the site of laser zona opening on the complete hatching of mouse blastocysts and their cell numbers. *Clin Exp Reprod Med.* 2016; 43 (3): 152–6. DOI: 10.5653/cecm.2016.43.3.152. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27689037; PMCID: PMC5039307.
  29. Montag M, van der Ven H. Laser-assisted hatching in assisted reproduction. *Croat Med J.* 1999; 40 (3): 398–403. PMID: 10411968.
  30. de Medeiros FW, Kaur H, Agrawal V, Chaurasia SS, Hammel J, et al. Effect of femtosecond laser energy level on corneal stromal cell death and inflammation. *J Refract Surg.* 2009; 25 (10): 869–74. DOI: 10.3928/1081597X-20090917-08.
  31. 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 (5): 482–90. DOI: 10.1070/QEL18047.

## ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОФИЛИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ МРНК ДЛЯ ПРОГНОЗА ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЛОКАЛЬНЫХ СТАДИЙ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

С. В. Гончаров <sup>✉</sup>, В. К. Боженко, М. В. Захаренко, А. А. Чаптыков, Т. М. Кулинич, В. А. Солодкий

Российский научный центр рентгенодиагностики, Москва, Россия

Оценка прогрессирования позволяет реализовать меры третичной профилактики колоректального рака (КРР), направленные на раннее выявление и своевременное лечение метастатической болезни. Целью исследования было разработать модель прогрессирования КРР с использованием патоморфологических и молекулярно-генетических характеристик опухоли. У 223 пациентов с КРР в стадиях  $T_{1-4}N_{0-2}M_0$  в образцах из опухоли были определены относительные уровни экспрессии мРНК 63 генов из разных функциональных групп. Медиана наблюдения 42 месяца. Сформированы логистические модели бинарного выбора, в которых целевой переменной служила вероятность прогрессирования в течение 36 месяцев от момента установки диагноза КРР. Объясняющими переменными были дифференцировка опухоли, ангиолимфатическая инвазия, соотношение числа метастатических лимфоузлов к их общему числу в операционном препарате, возраст пациента и локализация опухоли, а также показатели экспрессии генов *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3*. Точность прогноза в модели с использованием клинико-морфологических показателей составила 56,6%. Включение в модель профиля экспрессии генов *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3* повышает точность до 80,6%. Таким образом, прогнозирование прогрессирования КРР для персонализации лечения требует дополнительных показателей, выходящих за пределы информации, получаемой в рамках традиционной морфологической классификации TNM. Использование молекулярных маркеров в качестве предикторов значительно повышает точность прогнозирования прогрессирования КРР. Необходимы дальнейшие исследования для валидации и улучшения качества прогностических моделей.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, предиктивные маркеры, прогностические модели прогрессирования КРР, КРР

**Финансирование:** работа поддержана грантом РФФИ 22-15-00448.

**Вклад авторов:** С. В. Гончаров, В. К. Боженко, В. А. Солодкий — концепция и дизайн исследования; В. К. Боженко, С. В. Гончаров, Т. М. Кулинич, М. В. Захаренко, В. А. Солодкий — сбор и обработка материала; С. В. Гончаров, А. А. Чаптыков, В. К. Боженко, Т. М. Кулинич — написание текста; С. В. Гончаров, А. А. Чаптыков, В. К. Боженко, Т. М. Кулинич, М. В. Захаренко, В. А. Солодкий — редактирование.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «Российского научного центра рентгенодиагностики» МЗ РФ (протокол № 4 от 26 апреля 2018 г.), проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Сергей Владимирович Гончаров  
ул. Профсоюзная, д. 86, 117997, г. Москва, Россия; 9015@mail.ru

**Статья получена:** 13.09.2023 **Статья принята к печати:** 01.12.2023 **Опубликована онлайн:** 23.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.050

## THE POSSIBILITY OF EVALUATION MRNA EXPRESSION PROFILING TO PREDICT PROGRESSION OF LOCAL STAGE COLORECTAL CANCER

Goncharov SV <sup>✉</sup>, Bozhenko VK, Zakharenko MV, Chaptikov AA, Kulnich TM, Solodkiy VA

Russian Scientific Center of Roentgenradiology, Moscow, Russia

Progression assessment enables implementation of the colorectal cancer (CRC) tertiary prevention measures aimed at early detection and timely treatment of metastatic cancer. The study was aimed to develop a model of CRC progression using pathomorphological and molecular genetic characteristics of tumors. Relative expression of mRNAs of 63 genes from various functional groups was determined in the tumor specimens of 223 patients with stage  $T_{1-4}N_{0-2}M_0$  CRC. The median follow-up period was 42 months. Binary logistic regression models were constructed, in which likelihood of progression within 36 months after the CRC diagnosis was a target variable. Explanatory variables were as follows: tumor grade, angiolymphatic invasion, ratio of the number of metastatic lymph nodes to the total number of lymph nodes in the surgical specimen, patient's age and tumor localization, as well as expression levels of genes *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3*. Prediction accuracy of the model using clinical and morphological characteristics was 56.6%. Inclusion of *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3* expression profiles in the model increased accuracy to 80.6%. Thus, prediction of CRC progression for treatment personalization requires additional parameters beyond information acquired within the framework of conventional morphological TNM classification. The use of molecular markers as predictors significantly increases the CRC progression prediction accuracy. Further research is needed for validation and quality improvement of prognostic models.

**Keywords:** colorectal cancer, predictive markers, prognostic models of colorectal cancer progression, CRC

**Funding:** the study was supported through the grant by RSF 22-15-00448.

**Author contribution:** Goncharov SV, Bozhenko VK, Solodkiy VA — study concept and design; Bozhenko VK, Goncharov SV, Kulnich TM, Zakharenko MV, Solodkiy VA — data acquisition and processing; Goncharov SV, Chaptikov AA, Bozhenko VK, Kulnich TM — manuscript writing; Goncharov SV, Chaptikov AA, Bozhenko VK, Kulnich TM, Zakharenko MV, Solodkiy VA — editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Russian Scientific Center of Roentgenradiology (protocol № 4 dated 26 April 2018) and conducted in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki. All subjects submitted the informed consent to study participation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sergey V. Goncharov  
Profsoyuznaya, 86, 117997, Moscow, Russia; 9015@mail.ru

**Received:** 13.09.2023 **Accepted:** 01.12.2023 **Published online:** 23.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.050

Колоректальный рак (КРР) занимает одну из ведущих позиций в структуре онкологической заболеваемости в России и во всем мире. При этом распространенность рака ободочной кишки за последние 10 лет в РФ выросла с 116,7 до 161,0 случаев на 100 тыс. населения, а прямой кишки, соответственно, с 90,4 до 121,1 случаев [1].

В настоящее время стадия заболевания по системе TNM и степень дифференцировки являются основными параметрами, определяющими прогноз при КРР. Однако даже клинически однородные в отношении стадии и дифференцировки группы пациентов с КРР отличаются высокой гетерогенностью течения заболевания и неопределенным прогнозом. Подобное разнообразие связано с тем, что под видом одного и того же морфологического типа опухоли скрывается несколько ее разновидностей, которые различаются по своему молекулярному патогенезу и формируют биологическую гетерогенность опухоли.

Инструменты клинического прогнозирования, традиционно основанные на статистических регрессионных моделях, являются одним из методов объединения всей прогностической информации, которая позволяет избежать дальнейшей стратификации промежуточной системы TNM, основанной на бинарной логистической регрессии [2]. При надлежащей разработке и проверке эти инструменты могут интегрировать и персонализировать информацию о прогнозе у конкретного пациента и предоставить уточненную оценку риска прогрессирования для применения в клинической практике.

В настоящее время создано несколько тест-систем для определения прогноза заболевания и эффективности терапии, основанные на исследовании уровня экспрессии генов в ткани опухоли. Такие тест-системы, как OncotypeDX, ColoPrint, ColDx, определяют вероятность прогрессирования рака на основе оценки уровня экспрессии ряда генов в опухоли [3]. В некоторых работах прогностическая эффективность этих коммерческих систем подвергают критике. Так, есть сообщение о создании более эффективной системы прогнозирования прогрессирования КРР и ответа на лечение в I–II стадиях, чем OncotypeDX и ColoPrint [4]. Авторы формируют индивидуальный план лечения в начальных стадиях КРР, предлагая включать в схему адъювантную химиотерапию, чего обычно не происходит согласно актуальным международным и национальным клиническим рекомендациям.

Известны также специфические биологические предикторы для прогнозирования возможности метастазирования КРР в лимфатические узлы — белок теплового шока 47 (HSP47) [5]. Как утверждают авторы, его обнаружение тоже будет

индивидуализировать подход к лечению у пациентов с высоким риском метастазирования в лимфатические узлы.

В настоящее время постоянно предлагаются разнообразные модели прогнозирования, основанные как на использовании современных математических методов (нейросетевых моделей, моделей искусственного интеллекта, построения бинарного дерева классификации (BC, Binary classification tree), экспертных оценок и т. д.), так и на расширении набора объясняющих переменных (определение точечных мутаций, микросателлитной нестабильности, изучение микроопухолевого окружения и экспрессионных профилей). Тем не менее, потребность в совершенствовании моделей прогноза сохраняется. Эти обстоятельства побудили нас оценить возможность профилирования экспрессии мРНК из образцов опухоли для оценки прогноза при колоректальном раке.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены результаты профилей экспрессии мРНК 63 генов (табл. 1) потенциальных участников различных путей канцерогенеза, определенных в 217 образцах колоректальной аденокарциномы различной локализации. Образцы аденокарциномы правой половины ободочной кишки составили 23% (50 образцов), из левой половины ободочной кишки — 39,6% (86 образцов). Из опухолей прямой кишки 37,4% (81 образец). Мужчин было 97 (44,7%), женщин 120 (45,3%). Образцы отбирались в процессе патоморфологического исследования операционного материала. Критерий включения в исследование: наличие морфологически верифицированной колоректальной аденокарциномы в локальных стадиях T<sub>1-3</sub>, N<sub>0-2</sub>, M<sub>0</sub>. Какое-либо специальное противоопухолевое лечение до операции не проводилось. У всех пациентов в исследовании прослежены отдаленные результаты в срок не менее 36 месяцев. Медиана наблюдения составила 42 месяца. Критерием исключения явилось первично-множественное опухолевое поражение толстой кишки, а также наличие другого онкологического заболевания в анамнезе или на момент включения в исследование.

Методика выделения РНК и постановка ПЦР в реальном времени уже были опубликованы нами ранее [6]. В результате в каждом образце аденокарциномы различной эмбрионально-анатомической локализации был определен относительный уровень экспрессии мРНК изучаемой панели генов, относящихся к разным функциональным группам.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью открытого программного

Таблица 1. Гены, включенные в анализ

Биологический эффект в клетке	Наименование гена
Пролиферация	<i>Ki-67, CCND1, CCNB1, PTEN, STK-15(AURKA), P16INK4A, P14ARF, HER2/neu(C-erbB2), TERT</i>
Апоптоз	<i>BCL2, BAX, BAG1, NDRG1, BIRC5</i>
Транскрипция	<i>C-MYC, MYBL2</i>
Межклеточные взаимодействия	<i>MMP2, MMP7, MMP8, MMP9, MMP11, CTSL2, PAPP, TPA</i>
Дифференцировка клеток	<i>ESR1, PGR, CYP19A1, GRB7, CD45, CD56, CD68, CD69</i>
Факторы роста	<i>VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189, SCUBE2, IGF1, IGF2, TGFβ</i>
Регуляция иммунного ответа	<i>IL1β, IL2, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12α, IL15, COX-2, TNFα, TLR2, TLR4, TLR7, IFNγ, GNLX, HLA-G1, HLA-G5, LIF, LIFR, LGALS1, GATA3, IL2Rα, GREM1</i>
Метаболизм	<i>GSTM1</i>

Таблица 2. Логит-модель с использованием традиционных критериев прогнозирования риска прогрессирования КРР

Переменные	Коэффициент	Стандартная ошибка	z-статистика	Вероятность
Дифференцировка (G)	-0,834489	0,368047	-2,267346	0,0234
Лимфоваскулярная /ангиолимфатическая инвазия	-2,444482	0,582805	-4,194337	0
Соотношение числа удаленных к числу метастатических лимфоузлов	-1,511334	0,583617	-2,589598	0,0096
Возраст	0,047712	0,017803	2,680001	0,0074
Локализация опухоли	0,724943	0,454279	1,595811	0,1105
Константа	0,33256	1,114196	0,298475	0,7653
		McFadden R <sup>2</sup>	0,292908	

**Примечание:** Дифференцировка опухоли (G) — принимает значение «0», если степень дифференцировки G1 или G2, и «1» если G3; если нет признаков ангиолимфатической и/или лимфоваскулярной инвазии при гистологическом исследовании, то поперечная принимает значение «0», и «1» — если хоть один из таковых есть; соотношение числа метастатических лимфоузлов к общему числу, удаленных в операционном препарате. Принимает значение от 0 до 1; Возраст — возраст пациента, равный полному числу лет; Локализация — локализация опухоли: принимает значение «0» при правосторонней локализации опухоли (слепая, восходящая, поперечноободочная кишка) и «1» — при левосторонней (нисходящая ободочная, сигмовидная, прямая кишка); 0,332 — постоянный коэффициент (константа) в модели.

статистического пакета Jamovi (The Jamovi project; Австралия). Создаваемые логистические регрессионные модели оценивали показателями R2 и тестом на автокорреляцию Дурбина–Уотсона (DW). Качество модели считали приемлемым при значениях R2 > 0,3 и теста DW > 1,5.

Мы поставили перед собой задачу создать математическую модель бинарной логистической регрессии прогнозирования трехлетней безрецидивной выживаемости у пациентов с КРР, используя при этом полученные профили экспрессии мРНК с учетом данных патоморфологического заключения. Для этого был сформирован перечень объясняющих переменных, которые мы условно разделили на две группы. В первую вошли данные патоморфологического исследования операционного препарата: критерии T и N, степень дифференцировки, наличия лимфоваскулярной и ангиолимфатической инвазии, соотношение общего количества удаленных лимфоузлов к числу метастатических. Вторую группу объясняющих переменных составили профили экспрессии мРНК 63 генов из образцов опухоли. Для проверки прогностических способностей разрабатываемой модели первоначальная выборка пациентов была разделена случайным образом на две подвыборки: рабочую (90% наблюдений), на которой проводили построение модели, и контрольную (10% наблюдений), на ней оценивали вероятность прогнозирования по построенной модели. Процентные доли указанных подвыборок соответствуют общей практике, принятой в современной научной литературе. Расчет выполнен в программном пакете EViews (IHS Global Inc.; США) версии 7.0. По результатам оценивания и на основе сравнения конкурирующих пробит- и логит-моделей по критерию коэффициента детерминации МакФаддена, а также информационных критериев Акаике и Шварца, наиболее удачной оказалась логит-спецификация.

Таблица 3. Матрица классификации логит-модели на основании традиционных клинико-морфологических факторов риска прогрессирования КРР

	Фактические данные (число пациентов)	Верный прогноз (число пациентов)	Точность прогноза (%)
Без прогрессирования	139	123	88,4
Прогрессирование	78	29	37
Общая точность			56,62

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе логит-модель прогнозирования развития прогрессирования КРР в течение первых 36 месяцев от момента постановки диагноза была создана с использованием только традиционных клинико-морфологических критериев риска прогрессирования КРР в качестве объясняющих переменных (табл. 2).

Коэффициент R2 составил 0,29, тест Дурбина–Уотсона — 1,51. Эти показатели бинарной логистической модели позволяют считать, что анализ классических морфологических факторов риска прогрессирования, таких как дифференцировка аденокарциномы, локализация опухоли, общее число удаленных и количество метастатических лимфоузлов, предсказывает вероятность прогрессирования КРР с минимально удовлетворительной точностью. В табл. 3 представлена матрица классификации этой логит-модели.

На рис. 1 представлена точность прогнозирования разработанной модели с включением традиционных факторов прогноза.

Как мы уже обращали внимание, общая точность прогнозирования этой модели, составившая 56,62%, оказалась не высока, а точность прогноза у пациентов без прогрессирования, равную 37%, мы расценили как неудовлетворительную и на следующем этапе работы использовали профили экспрессии мРНК панели 63 генов из образцов опухоли в качестве дополнительных объясняющих переменных.

Результатом работы стало создание второй логит-модели, в которой в качестве объясняющих переменных к морфологическим показателям мы добавили профили экспрессии мРНК из образцов опухоли. Статистически значимыми в математической модели оказались 12 показателей (переменных) (табл. 4).

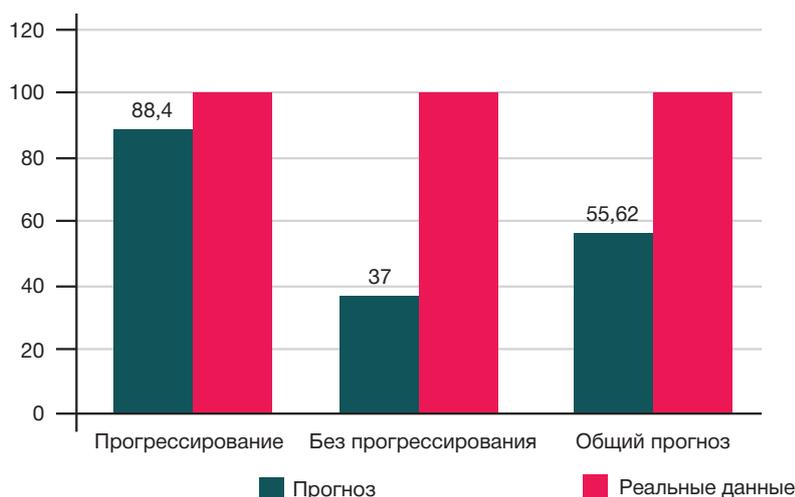


Рис. 1. Точность прогнозирования с использованием традиционных клинико-морфологических факторов риска прогрессирования КРР

Коэффициент R2 в этой модели составил уже 0,4, тест Дурбина–Уотсона 1,64. Существенное повышение точности разработанной модели достигнуто включением в регрессионное уравнение показателей экспрессии генов *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3* из образцов опухоли. Матрица классификации представлена в табл. 5.

Общая точность классификации составила 80,6% (рис. 2). Особо отметим, что точность прогнозирования у пациентов без прогрессирования повысилась с 37 до 70,5% в сравнении с первой моделью.

На основе этой модели мы рассчитали индивидуальный прогноз для каждого пациента в нашей выборке. На рис. 3 графически представлено распределение индивидуального риска в зависимости от выявления прогрессирования. Медиана показателя риска в группе без выявленного прогрессирования составила 57,1% [38,2; 70,7], а при его выявлении 79,2% [68,3; 96,4]. Различия показателей риска оказались статистически значимы (Крускал–Уоллис:  $p < 0,05$ ).

Оцениваемые патоморфологами в ходе рутинного исследования факторы риска прогрессирования колоректального рака позволяют сформировать лишь

минимально приемлемую с точки зрения точности прогностическую модель. Повышение точности прогностических моделей может быть достигнуто анализом информации вне патоморфологической стадии. Оценка профилирования экспрессии мРНК генов *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3* в опухолевых образцах позволяет повысить точность с 56,62 до 80,6%. Изменения экспрессии остальных генов панели тоже представляются важными, но их включение в модель не приводит к повышению ее точности вследствие мультиколлинеарности, что может дополнительно свидетельствовать о системности происходящих изменений в слизистой толстой кишки при развитии колоректального рака.

Мы заметили, что классические патоморфологические признаки высокого риска прогрессирования КРР, такие как лимфоваскулярная и ангиолимфатическая инвазия, дифференцировка, характер поражения лимфоузлов, имеют отрицательные регрессионные коэффициенты в прогностической модели, тогда как опухолевый супрессор *GATA3* имеет положительный коэффициент. Эта закономерность представляется логичной: усиление

Таблица 4. Логит-модель с использованием профилей экспрессии мРНК

Переменные	Коэффициент	Стандартная ошибка	z-Статистика	Вероятность
Лимфоваскулярная/ангиолимфатическая инвазия	-2,631111	0,657195	-4,003548	0,0001
Соотношение числа удаленных к числу метастатических лимфоузлов («лимфоузлы»)	-2,101045	0,67982	-3,09059	0,002
Возраст	0,05032	0,019404	2,593334	0,0095
Дифференцировка (G)	-1,028091	0,415533	-2,474153	0,0134
<i>CCNB1</i>	0,535019	0,207419	2,579411	0,0099
<i>Ki67</i>	-0,511469	0,276974	-1,846634	0,0648
<i>GRB7</i>	-0,456156	0,185794	-2,455168	0,0141
<i>IGF1</i>	-0,196378	0,079666	-2,465027	0,0137
<i>IL2</i>	-0,245648	0,100843	-2,435952	0,0149
<i>IL6</i>	0,202048	0,092241	2,190427	0,0285
<i>IL8</i>	-0,234825	0,094272	-2,490925	0,0127
<i>GATA3</i>	0,333421	0,174847	1,906929	0,0565
Константа	11,04682	3,481664	3,172857	0,0015
		McFadden R <sup>2</sup>		0,403

**Примечание:** Дифференцировка опухоли (G) — принимает значение «0», если степень дифференцировки G1 или G2, и «1», если G3; если нет признаков ангиолимфатической и/или лимфоваскулярной инвазии при гистологическом исследовании, то попеременная принимает значение «0», и «1», если хоть один из таковых есть; соотношение числа метастатических лимфоузлов к общему числу, удаленных в операционном препарате. Принимает значение от 0 до 1; Возраст — возраст пациента, равный полному числу лет; *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3* — уровни экспрессии соответствующего гена в опухоли; 11,05 — постоянный коэффициент в модели.

Таблица 5. Матрица классификации логит-модели с использованием профилей экспрессии мРНК восьми генов

	Фактические данные (число пациентов)	Верный прогноз (число пациентов)	Точность прогноза (%)
Без прогрессирования	139	120	86,3
Прогрессирование	78	55	70,5
Общая точность			80,6

активности онкосупрессора GATA3 характерно для менее агрессивного течения КРР [7], тогда как наличие метастатических лимфоузлов в препарате, низкой дифференцировки и ангиолимфатической инвазии свидетельствует о высоком риске прогрессирования.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Актуальная задача улучшения результатов третичной профилактики колоректального рака в локальных стадиях неразрывно связана с объективной стратификацией его прогноза с целью персонализации терапии и, что особенно важно, оценкой эффективности существующих и перспективных схем лечения. И хотя до настоящего времени патоморфологическая стадия КРР является основой для формирования прогноза прогрессирования заболевания, именно изучение информации о патологическом прогрессе без привязки к стадии КРР может стать ключом к решению задачи оценки риска прогрессирования. Такой информацией, в первую очередь, могут быть молекулярно-генетические данные, полученные при анализе тканей пораженного органа. В разработанной математической прогностической логит-модели прогрессирования нами использованы 12 показателей, полученные при патоморфологическом и молекулярно-генетическом исследовании опухоли. Они включают в себя как общепринятые факторы риска в виде степени дифференцировки опухоли, наличия ангиолимфатической и периневральной инвазии, а также характер изменений лимфоузлов, удаленных во время операции, и показатели экспрессии мРНК 8 генов: *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *IL2*, *IL6*, *IL8*, *GATA3*.

Роль этих генов в онкогенезе неоднократно обсуждали в литературе [8–12]. Эти гены относятся к функциональным группам регуляторов клеточного цикла (*CCNB1*), пролиферации (*Ki-67*, *GRB7*), факторов роста (*IGF-1*) и цитокинов (*IL2*, *IL6*, *IL8*), участвующих в инвазии и метастазировании колоректального рака [12].

Сравнивая собственные результаты с уже имеющимися данными, в том числе с отчетами крупных исследований, мы обратили внимание, что однозначная интерпретация характеристик дифференцировки опухоли, ангиолимфатической и лимфоваскулярной инвазии затруднены отсутствием единой системы классификации и стандартов оценки [13–15]. Это позволяет данным показателям значительно варьироваться в разных клиниках [16, 17], так, например, считается, что частота выявления PNI, как правило, занижена, при этом показатели обнаружения варьируются от 9 до 42% [18]. Роль соотношения числа удаленных лимфоузлов в препарате к числу метастатических при КРР была первоначально изучена в 2005 г. [19]. Этот показатель был определен как отрицательный независимый прогностический фактор на III стадии и связан с уменьшением общей и безрецидивной выживаемости при КРР. Он оказывает более сильное влияние на прогноз при раке прямой кишки, чем при раке ободочной кишки. Его прогностическое значение повышается при исследовании более 12 лимфатических узлов. Критическое значение этого показателя варьируется от 0,125 до 0,3 в различных исследованиях. По-прежнему нет консенсуса относительно минимального количества собранных лимфатических узлов для надлежащей оценки этого показателя.

Нельзя не отметить, что в последние годы благодаря усилиям медицинских сообществ стали доступны клиничко-геномные базы данных. Анализируя их, можно лучше понять геномный ландшафт КРР и оценить эффективность и безопасность лечения в подгруппах пациентов с различными геномными профилями. В литературе встречаются указания, что различия между базами данных по демографическим, клиническим характеристикам, схемам лечения и общей выживаемости необходимо учитывать при разработке исследований и интерпретации результатов, полученных в клиничко-геномных базах [20].

Тем не менее, наши результаты подтверждают сформировавшуюся тенденцию: анализ дополнительной

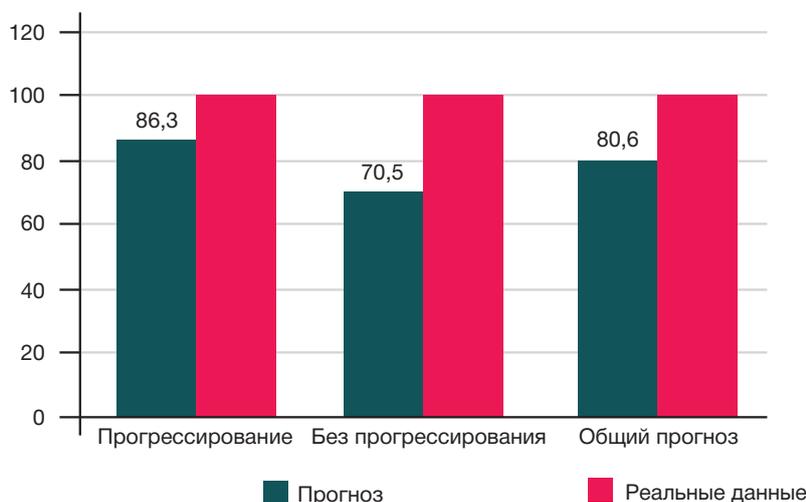


Рис. 2. Точность прогноза логит-модели с использованием профилей экспрессии мРНК восьми генов

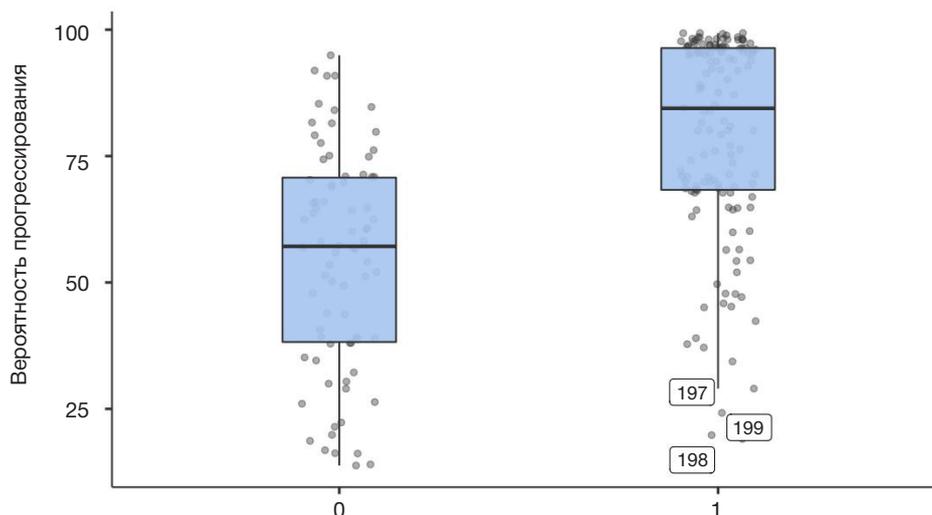


Рис. 3. Распределение индивидуального прогноза в модели с использованием клинично-морфологических факторов риска прогрессирования

информации, в первую очередь молекулярно-генетической, вне патоморфологической стадии при колоректальном раке существенно повышает точность прогнозирования вероятности прогрессирования. При этом поиск новых предикторов, и что не менее важно, широкая валидация прогностических систем, должна быть продолжена.

## ВЫВОДЫ

Мы установили, что факторы риска прогрессирования КРР, выявляемые при стандартном патоморфологическом исследовании, в нашей выборке пациентов при использовании прогностической логит-модели бинарного

выбора обеспечивают точность прогноза, равную 56,62%. При этом ошибки классификации возникают в основном из-за пациентов, у которых прогрессирование не развивалось в течение 36-месячного периода наблюдения. Включение в модель, в качестве объясняющих переменных показателей экспрессии мРНК генов *CCNB1*, *Ki67*, *GRB7*, *IGF1*, *Il2*, *Il6*, *Il8*, *GATA3* из опухолевых образцов, повышает точность прогнозирования до 80,6%. Это позволяет считать, что расширение поиска предикторов прогноза вне патоморфологической стадии системы TNM — перспективный путь повышения его точности с целью реализации эффективных мер третичной профилактики КРР.

## Литература

- Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А.О. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. Российский Центр информационных технологий и эпидемиологических исследований в области онкологии. Москва, 2022.
- Steyerberg EW, Moons KGM, van der Windt DA, et al. Prognosis Research Strategy (PROGRESS) 3: prognostic model research. *PLoS medicine*. 2013; 10: e1001381.
- Brenner H, Chen C. The colorectal cancer epidemic: challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention. *Br J Cancer*. 2018; 119 (7): 785–92. DOI: 10.1038/s41416-018-0264-x. Epub 2018 Oct 4. PMID: 30287914; PMCID: PMC6189126.
- Lin XT, Wu QN, Qin S, Fan DJ, Lv MY, Chen X, et al. Identification of an Autophagy-Related Gene Signature for the Prediction of Prognosis in Early-Stage Colorectal Cancer. *Front Genet*. 2021; 12: 755789. DOI: 10.3389/fgene.2021.755789. PMID: 34899841; PMCID: PMC8657766.
- Mori K, Toiyama Y, Okugawa Y, Ichikawa T, Nagano Y, Oki S, et al. Preoperative heat shock protein 47 levels identify colorectal cancer patients with lymph node metastasis and poor prognosis. *Oncol Lett*. 2020; 20 (6): 333. DOI: 10.3892/ol.2020.12196. Epub 2020 Oct 7. PMID: 33123244; PMCID: PMC7583735.
- Боженко В. К., Станоевич У. С., Троценко И. Д. и др. Сравнение экспрессии мРНК матричных металлопротеиназ в морфологически нормальной, неопластической и метастатической тканях толстого кишечника и в биоптатах здоровых доноров. *Биомедицинская химия*. 2018; 64 (1): 46–52. DOI: 10.18097/PBMC20186401046.
- French CL, Ye F, Revetta F, et al. Linking patient outcome to high throughput protein expression data identifies novel regulators of colorectal adenocarcinoma aggressiveness. *F1000Res*. 2015; 4: 99. DOI: 10.12688/f1000research.6388.1.
- Fang Y, Yu H, Liang X, Xu J, Cai X. Chk1-induced CCNB1 overexpression promotes cell proliferation and tumor growth in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2014; 15 (9): 1268–79. DOI: 10.4161/cbt.29691. Epub 2014 Jun 27. PMID: 24971465; PMCID: PMC4128869.
- Hu B, Song X, Ding W, Wang H, Cai H, Huang Z. Expression and Clinical Significance of Ki67 and SOX2 in Colorectal Cancer. *J Healthc Eng*. 2023; 2023: 3783631. DOI: 10.1155/2023/3783631. PMID: 37457497; PMCID: PMC10348847.
- Vermehren-Schmaedick A, Mhawech-Fauceglia P, Park BS, Pejovic T, Luoh SW. The prognostic significance of GRB7 protein expression and localization in human breast and ovarian cancers. *Oncotarget*. 2020; 11 (24): 2273–89. DOI: 10.18632/oncotarget.27593. PMID: 32595827; PMCID: PMC7299530.
- Kasprzak A. Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) Signaling in Glucose Metabolism in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (12): 6434. DOI: 10.3390/ijms22126434. PMID: 34208601; PMCID: PMC8234711.
- Li J, Huang L, Zhao H, Yan Y, Lu J. The Role of Interleukins in Colorectal Cancer. *Int J Biol Sci*. 2020; 16 (13): 2323–39. DOI: 10.7150/ijbs.46651. PMID: 32760201; PMCID: PMC7378639.
- Ueno H, Hase K, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Tanaka M, Miyake O, et al. Site-specific tumor grading system in colorectal cancer: Multicenter pathologic review of the value of quantifying poorly differentiated clusters. *Am J Surg Pathol*. 2014; 38: 197–204. Available from: <https://doi.org/10.1097/pas.000000000000113/>
- Yuan H, Dong Q, Zheng BA, Hu X, Xu J-B, Tu S. Lymphovascular

- invasion is a high risk factor for stage I/II colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8: 46565–79. Available from: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15425>.
15. Al-Sukhni E, Attwood K, Gabriel EM, LeVea CM, Kanehira K, Nurkin SJ. Lymphovascular and perineural invasion are associated with poor prognostic features and outcomes in colorectal cancer: A retrospective cohort study. *Int J Surg*. 2017; 37: 42–49. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2016.08.528>.
  16. Harris EI, Lewin DN, Wang HL, Lauwers GY, Srivastava A, Shyr Y, et al. Lymphovascular invasion in colorectal cancer: An interobserver variability study. *Am J Surg Pathol*. 2008; 32: 1816.
  17. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: A review of the literature. *Cancer: Inter-discip. Int J Am Cancer Soc*. 2009; 115: 3379–91.
  18. (CAP) CoAP. Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Primary Carcinoma of the Colon and Rectum; 2020. Available online: <https://documents.cap.org/protocols/cp-gilower-colonrectum-resection-20-4100.pdf> (accessed on 15 August 2021).
  19. Berger AC, Sigurdson ER, LeVoyer T, Hanlon A, Mayer RJ, Macdonald JS, et al. Colon cancer survival is associated with decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005; 23: 8706–12. Available from: <https://doi.org/10.1200/jco.2005.02.8852>.
  20. Wang CY, Shao C, McDonald AC, Amonkar MM, Zhou W, Bortnichak EA, et al. Evaluation and Comparison of Real-World Databases for Conducting Research in Patients With Colorectal Cancer. *JCO Clin Cancer Inform*. 2023; 7: e2200184. DOI: 10.1200/CCI.22.00184. PMID: 37437227.
- References**
1. Kaprin AD, Starinskij VV, Shahzadova AO. Sostojanie onkologicheskoy pomoshhi naseleniju Rossii v 2021 godu. Rossijskij Centr informacionnyh tehnologij i jepidemiologicheskikh issledovanij v oblasti onkologii. Moskva, 2022. Russian.
  2. Steyerberg EW, Moons KGM, van der Windt DA, et al. Prognosis Research Strategy (PROGRESS) 3: prognostic model research. *PLoS medicine*. 2013; 10: e1001381.
  3. Brenner H, Chen C. The colorectal cancer epidemic: challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention. *Br J Cancer*. 2018; 119 (7): 785–92. DOI: 10.1038/s41416-018-0264-x. Epub 2018 Oct 4. PMID: 30287914; PMCID: PMC6189126.
  4. Lin XT, Wu QN, Qin S, Fan DJ, Lv MY, Chen X, et al. Identification of an Autophagy-Related Gene Signature for the Prediction of Prognosis in Early-Stage Colorectal Cancer. *Front Genet*. 2021; 12: 755789. DOI: 10.3389/fgene.2021.755789. PMID: 34899841; PMCID: PMC8657766.
  5. Mori K, Toyama Y, Okugawa Y, Ichikawa T, Nagano Y, Oki S, et al. Preoperative heat shock protein 47 levels identify colorectal cancer patients with lymph node metastasis and poor prognosis. *Oncol Lett*. 2020; 20 (6): 333. DOI: 10.3892/ol.2020.12196. Epub 2020 Oct 7. PMID: 33123244; PMCID: PMC7583735.
  6. Bozhenko VK, Stanojevic US, Trotsenko ID, et al. Comparison of matrix proteinase mRNA expression in morphologically normal, neoplastic, and metastatic colon tissue and colon biopsies from healthy donors. *Biomed Khim*. 2018; 64 (1): 46–52. DOI: 10.18097/PBMC20186401046. Russian.
  7. French CL, Ye F, Revetta F, et al. Linking patient outcome to high throughput protein expression data identifies novel regulators of colorectal adenocarcinoma aggressiveness. *F1000Res*. 2015; 4: 99. DOI: 10.12688/f1000research.6388.1.
  8. Fang Y, Yu H, Liang X, Xu J, Cai X. Chk1-induced CCNB1 overexpression promotes cell proliferation and tumor growth in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2014; 15 (9): 1268–79. DOI: 10.4161/cbt.29691. Epub 2014 Jun 27. PMID: 24971465; PMCID: PMC4128869.
  9. Hu B, Song X, Ding W, Wang H, Cai H, Huang Z. Expression and Clinical Significance of Ki67 and SOX2 in Colorectal Cancer. *J Healthc Eng*. 2023; 2023: 3783631. DOI: 10.1155/2023/3783631. PMID: 37457497; PMCID: PMC10348847.
  10. Vermehren-Schmaedick A, Mhaweck-Faucegglia P, Park BS, Pejovic T, Luoh SW. The prognostic significance of GRB7 protein expression and localization in human breast and ovarian cancers. *Oncotarget*. 2020; 11 (24): 2273–89. DOI: 10.18632/oncotarget.27593. PMID: 32595827; PMCID: PMC7299530.
  11. Kasprzak A. Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) Signaling in Glucose Metabolism in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (12): 6434. DOI: 10.3390/ijms22126434. PMID: 34208601; PMCID: PMC8234711.
  12. Li J, Huang L, Zhao H, Yan Y, Lu J. The Role of Interleukins in Colorectal Cancer. *Int J Biol Sci*. 2020; 16 (13): 2323–39. DOI: 10.7150/ijbs.46651. PMID: 32760201; PMCID: PMC7378639.
  13. Ueno H, Hase K, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Tanaka M, Miyake O, et al. Site-specific tumor grading system in colorectal cancer: Multicenter pathologic review of the value of quantifying poorly differentiated clusters. *Am J Surg Pathol*. 2014; 38: 197–204. Available from: <https://doi.org/10.1097/pas.000000000000113/>
  14. Yuan H, Dong Q, Zheng BA, Hu X, Xu J-B, Tu S. Lymphovascular invasion is a high risk factor for stage I/II colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8: 46565–79. Available from: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15425>.
  15. Al-Sukhni E, Attwood K, Gabriel EM, LeVea CM, Kanehira K, Nurkin SJ. Lymphovascular and perineural invasion are associated with poor prognostic features and outcomes in colorectal cancer: A retrospective cohort study. *Int J Surg*. 2017; 37: 42–49. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2016.08.528>.
  16. Harris EI, Lewin DN, Wang HL, Lauwers GY, Srivastava A, Shyr Y, et al. Lymphovascular invasion in colorectal cancer: An interobserver variability study. *Am J Surg Pathol*. 2008; 32: 1816.
  17. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: A review of the literature. *Cancer: Inter-discip. Int J Am Cancer Soc*. 2009; 115: 3379–91.
  18. (CAP) CoAP. Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Primary Carcinoma of the Colon and Rectum; 2020. Available online: <https://documents.cap.org/protocols/cp-gilower-colonrectum-resection-20-4100.pdf> (accessed on 15 August 2021).
  19. Berger AC, Sigurdson ER, LeVoyer T, Hanlon A, Mayer RJ, Macdonald JS, et al. Colon cancer survival is associated with decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005; 23: 8706–12. Available from: <https://doi.org/10.1200/jco.2005.02.8852>.
  20. Wang CY, Shao C, McDonald AC, Amonkar MM, Zhou W, Bortnichak EA, et al. Evaluation and Comparison of Real-World Databases for Conducting Research in Patients With Colorectal Cancer. *JCO Clin Cancer Inform*. 2023; 7: e2200184. DOI: 10.1200/CCI.22.00184. PMID: 37437227.

## КОМБИНИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ

К. В. Коломиец ✉, Э. С. Пономарева, Я. Р. Посыпина, И. И. Михайлов, Ч. Б. Манджиев, Е. В. Поветкина, Р. Р. Тугуз, С. М. Булгаков, В. И. Репунова

Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, Россия

Увеальная меланома (УМ) — редкая первичная злокачественная опухоль, формирующаяся из меланоцитов увеального тракта (хориоидеи (90%), цилиарного тела (6%), радужной оболочки (4%)) глазного яблока. По совокупным данным, уровень заболеваемости составляет 5,2 случая на 1 млн населения. В России этот показатель в разных регионах варьирует от 6,23 до 8 случаев на 1 млн взрослого населения. Наиболее часто (89–93%) УМ метастазирует в печень. Представлен клинический случай использования методики трансартериальной химиэмболизации (карбоплатин) в комбинации с иммунотерапией (ниволумаб + ипилимумаб) у пациента с метастатическим поражением печени увеальной меланомой. Был достигнут контроль заболевания на протяжении 12 месяцев, что, в свою очередь, демонстрирует возможность и эффективность мультидисциплинарного подхода.

**Ключевые слова:** увеальная меланома, трансартериальная химиэмболизация, иммунотерапия, карбоплатин, метастатическое поражение печени

**Вклад авторов:** К. В. Коломиец — написание статьи, редактирование; Э. С. Пономарева, Я. Р. Посыпина — написание статьи, обзор литературы, анализ данных; И. И. Михайлов, Ч. Б. Манджиев — написание статьи, обзор литературы, сбор данных; С.М. Булгаков, В. И. Репунова — написание статьи, обзор литературы, концепция и дизайн; Е. В. Поветкина, Р. Р. Тугуз — написание статьи, обзор литературы, переработка статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** пациент подписал добровольное информированное согласие на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме.

✉ **Для корреспонденции:** Карина Викторовна Коломиец  
ул. Красноармейская, д. 198, г. Новочеркасск, 346400, Россия; karina\_kolomiets\_99@mail.ru

**Статья получена:** 22.10.2023 **Статья принята к печати:** 29.11.2023 **Опубликована онлайн:** 22.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.051

## METHODS FOR COMBINATION TREATMENT OF METASTATIC UVEAL MELANOMA

Kolomiets KV ✉, Ponomareva ES, Posypina YaR, Mihailov II, Mandzhiev CB, Povetkina EV, Tuguz RR, Bulgakov SM, Repunova VI

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

Uveal melanoma (UM) is a rare primary malignant tumor originating from uveal melanocytes (choroid (90%), ciliary body (6%), iris (4%)) of the eye. According to the aggregate data, the tumor incidence is 5.2 cases per 1 million population. In Russia this value varies between 6.23–8 cases per 1 million adult population across the regions. UM most often spreads to the liver (89–93%). The clinical case of using transarterial chemoembolization (carboplatin) in combination with immunotherapy (nivolumab + ipilimumab) in patients with metastatic liver disease from UM is provided. The disease control within 12 months has been achieved, which, in turn, demonstrates the possibility and efficacy of multidisciplinary approach.

**Keywords:** uveal melanoma, transarterial chemoembolization, immunotherapy, carboplatin, metastatic liver disease

**Author contribution:** Kolomiets KV — manuscript writing, editing; Ponomareva ES, Posypina YaR — manuscript writing, literature review, data analysis; Mihailov II, Mandzhiev CB — manuscript writing, literature review, data acquisition; Bulgakov SM, Repunova VI — manuscript writing, literature review, concept and design; Povetkina EV, Tuguz RR — manuscript writing, literature review, manuscript revision.

**Compliance with ethical standards:** the patient submitted the informed consent to publication of the anonymized personal medical data.

✉ **Correspondence should be addressed:** Karina V. Kolomiets  
Krasnoarmeiskaya, 198, Novocherkassk, 346400, Russia; karina\_kolomiets\_99@mail.ru

**Received:** 22.10.2023 **Accepted:** 29.11.2023 **Published online:** 22.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.051

Увеальная меланома (УМ) — редкая первичная злокачественная опухоль, формирующаяся из меланоцитов увеального тракта (хориоидеи (90%), цилиарного тела (6%), радужной оболочки (4%)) глазного яблока. По совокупным данным, уровень заболеваемости составляет 5,2 случая на 1 млн населения. В России этот показатель в разных регионах варьирует от 6,23 до 8 случаев на 1 млн взрослого населения. Средний возраст на момент постановки диагноза составляет 62 года, а пиковый возрастной диапазон — от 70 до 79 лет [1, 2]. Однако, несмотря на достигнутые успехи в лечении первичной опухоли и радикализм оперативного вмешательства, у большинства пациентов развиваются отдаленные метастазы. Во время первичной диагностики опухоли глаза метастатическое заболевание обнаруживают менее чем у 2% пациентов. В 89–93% случаев основным органом метастазирования становится печень. Данную тропность УМ к гепатоцитам печени объясняют наличием на поверхности клеток трех видов рецепторов, гиперэкспрессированных в

первичной опухоли: IGF-1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста), cMET (HGFR — рецептора фактора роста гепатоцитов) и CXCR4 (рецептора хемокинов), основная функция которых — контроль клеточной миграции, регулирование инвазии и пролиферации в опухолевых клетках [3, 4]. Медиана общей выживаемости (ОВ) без хирургического лечения у данной группы пациентов достигает 2–3 мес.

Наиболее распространенные методы лечения метастазов УМ в печени — это иммунотерапия, трансартериальная химиэмболизация (ТАХЭ), иммуноэмболизация, радиоэмболизация, термическая абляция, а также изолированная химиоперфузия.

Об использовании ТАХЭ для контроля роста метастатических опухолей меланомы в печени впервые сообщено в 1986 г. В 1986 г. было начато использование цисплатина и частиц поливинилового спирта во время химиоэмболизации для контроля роста метастазов УМ в печени [5].

На данный момент опубликовано 19 исследований об эффективности ТАХЭ при метастатическом поражении печени УМ, из которых 13 ретроспективных, пять перспективных и одно рандомизированное. Медиана общей выживаемости (ОВ) колеблется от 5,2 до 23 мес. Цисплатин был наиболее часто используемым препаратом. Другие химиотерапевтические средства включали: винбластин, дакарбазин, винкристин, дактиномицин, кармустин, митомицин С, доксорубицин, иринотекан, паклитаксел, карбоплатин и мелфалан [1, 2].

Несмотря на достижения в лечении метастатической меланомы кожи, УМ остается малочувствительной к медикаментозной терапии, будь то современная иммунотерапия с ингибиторами контрольных точек, таргетная или химиотерапия. Тем не менее, несмотря на более низкую эффективность комбинированной иммунотерапии для УМ по сравнению с меланомой кожи, была все же отмечена ее положительная роль в последние годы. По данным разных авторов, несмотря на однолетнюю выживаемость в пределах 30–50%, в настоящее время комбинацию ипилимумаба и ниволумаба признают наиболее эффективной среди других малоэффективных вариантов терапии.

В 2019 г. был проведен ретроспективный анализ результатов лечения восьми пациентов с метастатической УМ. Пациентами была получена комбинированная иммунотерапия ипилимумабом и ниволумабом в сочетании с ТАХЭ, а затем поддерживающей терапией ниволумабом. Для 5 из 8 пациентов со стадией M1a удалось достичь продолжительности жизни от 12 до 24 месяцев. У трех пациентов со стадией M1b продолжительность жизни составила от 7 до 30 месяцев. Два пациента достигли частичного ответа, четыре пациента — стабилизации заболевания, а у двух наблюдали прогрессирование. Медиана ОВ (от даты начала иммунотерапии до даты смерти/даты последнего наблюдения), рассчитанная по методике Каплана–Мейера, для восьми пациентов составила 14,2 месяца [6, 7].

Были изучены уровни лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и обнаружено, что частота полного ответа у пациентов, ЛДГ которых выше нормы, была очень низкой — только один пациент из 105 имел полный ответ. Показатель ЛДГ вышел из учета прогностических факторов полного ответа, когда во внимание были приняты PD-L1 и опухолевая нагрузка. Последняя, как известно, представляет собой важный фактор при рассмотрении вероятности положительного ответа и длительной выживаемости с таким препаратом, как пембролизумаб (блокирующее антитело к PD-L1) [8].

Целью данного клинического случая была демонстрация возможности и эффективности мультидисциплинарного подхода: применение ТАХЭ (карбоплатин) в комбинации с иммунотерапией при метастатическом поражении печени УМ.

### Описание клинического случая

Больной П., 62 лет, в феврале 2023 г. обратился в клинику. В феврале 2019 г. при офтальмологическом обследовании была выявлена увеальная меланома левого глаза цилиохориоидальной локализации, размерами, по данным УЗИ, 13 x 14 мм. Учитывая размеры новообразования, отсутствие прозрачности оптических сред, было рекомендовано ликвидационное лечение. 07.07.2020 в МУЗ «ГБСМП» г. Волгодонска было выполнено хирургическое лечение в объеме: энуклеация левого глаза.

Заключение по гистологическому исследованию операционного материала от 27.08.2020: УМ из невосоподобных и веретенчатых клеток. Инвазия опухоли в склеру на отдельных участках. В опухоли большое количество меланина. Определяется высокая митотическая активность, васкулярная инвазия.

Далее пациент каждые три месяца проходил плановые контрольные исследования, при которых спустя 17 месяцев, а также увеличении интервала времени между последними инструментальными исследованиями в 2 раза (6 месяцев), после энуклеации левого глаза было выявлено образование правой доли печени (S6-S7) до 8 см в диаметре, которое ранее не визуализировалось. Спустя две недели при выполнении компьютерной томографии органов брюшной полости (КТ ОБП) было обнаружено еще одно образование до 1,5 см в диаметре в S8 печени, на основании чего целесообразно сделать вывод о том, что необходимо всем пациентам выполнять лучевую диагностику в оптимальном объеме:

- по данным МРТ (магнитно-резонансной томографии) ОБП от 21.08.2020: МР картина диффузных изменений поджелудочной железы;

- данные лабораторных методов исследований от 23.11.2020 в пределах возрастной нормы, за исключением повышения уровня ЛДГ до 458 Ед/л (референсные значения: 135–225 Ед/л).

18.11.2020 — СКТ (спиральная компьютерная томография) ОБП и забрюшинного пространства, выявившая диффузные изменения ткани печени, поджелудочной железы, простую кисту правой почки;

- данные лабораторных методов исследований от 29.11.2021 в пределах возрастной нормы, уровень ЛДГ 223,0 Ед/л, СОЭ (скорость оседания эритроцитов) — 48 мм.

СКТ ОБП от 19.11.2021 — определяется образование левого надпочечника 1,7 x 1,4 см, вероятно, обусловленное аденомой.

МРТ ОБП от 18.11.2021 — заключение: диффузные изменения поджелудочной железы, киста правой почки, аденома левого надпочечника;

- данные лабораторных методов исследований от 13.05.2022 в пределах возрастной нормы, уровень ЛДГ 277,0 Ед/л, СОЭ — 42 мм.

МРТ ОБП от 19.05.2022 — МР-признаки диффузных изменений ткани печени и поджелудочной железы. Объемное образование в левом надпочечнике (аденома, инциденталомы).

По данным КТ ОБП от 25.11.2022, заключение: образования правой доли печени (ранее не визуализировались).

КТ ОБП с контрастным усилением от 13.12.2022: выявлены КТ-признаки образований правой доли печени метастатического характера (S7-S6 образование неоднородной пониженной плотности, без четких контуров, размерами 78 x 47 x 75 мм, неоднородно накапливающее контраст; в S8 — очаг пониженной плотности диаметром 14 мм (ранее не визуализировались), слабо накапливающий контраст.

Протокол гистологического исследования от 19.12.2022, заключение: фрагмент печени с наличием солидной опухоли с очагами некроза, состоящей из атипичных эпителиоидных клеток с гиперхромными ядрами, с эозинофильной цитоплазмой без четких контуров; в части клеток отмечается содержание пигмента меланина. В трепан-биоптате печени — метастаз меланомы.

Был поставлен диагноз: вторичное метастатическое поражение печени; увеальная меланома левого глаза

T3вN0M0, St III A, состояние после хирургического лечения (07.2020), прогрессирование (11.2022), (НЕР), кл. гр. 2.

Локальный статус при офтальмологическом осмотре: анофтальма слева, рецидивирующий герпетический кератит (эпителиальная дистрофия роговицы), сенильная незрелая смешанная катаракта, пигментный невос хориоидеи правого глаза.

При плановой консультации химиотерапевта от 29.12.2022: согласно клиническим рекомендациям, учитывая динамику заболевания, рекомендовано назначить иммунотерапию (ИТ), при удовлетворительных общеклинических показателях крови, а также при отсутствии соматических противопоказаний по схеме: ниволумаб 3 мг/кг в первый день + ипилимумаб 1 мг/кг в первый день; цикл — 21 день.

Пациент обратился в клинику РостГМУ после первого курса ИТ в феврале 2023 г., где с учетом объема поражения печени, данных анамнеза заболевания и инструментальных методов исследования, распространенности процесса консилиумом было принято решение выполнить трансартериальную химиоэмболизацию (ТАХЭ).

Описание оперативного вмешательства от 24.02.2023: в асептических условиях рентгеноперационной в положении больного лежа на спине после соответствующей обработки операционного поля выполнена пункция правой лучевой артерии в типичном месте (игла ангиографическая 18G). Артерия катетеризована по Сельдингеру (интродьюсер 5F 11 см). Катетер 5F NH1 125 см по гидрофильному проводнику 035" 180 см последовательно проведен в правую плечевую артерию, подмышечную артерию, плечевого ствола, дугу аорты, грудную аорту. Удален проводник, выполнена аортография — чревный ствол отходит на уровне L1. Произведена селективная катетеризация устья чревного ствола — ход крапильный, селезеночная артерия не расширена, извитая, гипертрофии желудочных ветвей (анастомозов) не определяется. Общая печеночная артерия отходит от чревного ствола обычно, деление на левую, правую печеночные артерии, ответвление гастродуоденальной артерии без особенностей. Произведена замена проводника на катетере. Катетером Н1 125 см на микропроводнике Asahi Chikai (ASAHI INTECC CO., LTD; Япония) 0.014" 165 см селективно катетеризована правая печеночная артерия, кровоснабжающая опухолевые очаги. Выполнена ТАХЭ артерий, кровоснабжающих очаги (липиодол 20 мл + карбоплатин 450 мг). Артериальная эмболизация выполнена гемостатической губкой Cutanplast (Mascia Brunelli; Италия). При контрольной ангиографии определяется выраженное замедление контрастирования по сегментарным ветвям правой печеночной артерии, кровоснабжающим опухолевые очаги. Признаков нецелевой эмболизации не выявлено. Катетер выведен в аорту, при контрольной ангиографии — правая, левая печеночные, гастродуоденальная, верхняя брыжеечная артерии не скомпрометированы. Инструментарий последовательно удален. Удален интродьюсер, осуществлен гемостаз компрессией — 8 мин — стабильный, асептическая давящая повязка.

Была назначена послеоперационная сопроводительная фармакотерапия с целью профилактики тромбоэмболических осложнений, которая включала в себя антикоагулянты, а также нестероидные противовоспалительные средства в качестве препаратов для аналгезии, так как у значительного количества пациентов 90–100% после проведения ТАХЭ наблюдают постэмболизационный

синдром (ПЭС), длительность которого составляет от двух суток до трех недель. Считается, что он опосредован воспалительными цитокинами, высвобождаемыми в результате некроза печени, вызванного эмболизацией или химиотерапевтическими ЛС. Основные проявления ПЭС: повышение температуры тела, боли в правом подреберье/эпигастрии, тошнота, рвота, некоторое усугубление печеночной недостаточности и как следствие — повышение уровня трансаминаз. Однако, к счастью, явления ПЭС успешно купируются симптоматической медикаментозной терапией.

Больной был выписан на восьмые сутки после проведения оперативного вмешательства, на момент выписки свое состояние оценивал как удовлетворительное, несмотря на объем метастатических очагов; отмечали незначительное повышение температуры в течение первых трех дней, а также умеренные боли в правом подреберье и эпигастрии после проведения ТАХЭ.

Далее пациент проходил курсы ИТ (три курса) по месту жительства, при контрольном обследовании выявлена положительная динамика.

По данным КТ ОБП с контрастным усилением от 27.04.2023, выявлены КТ-признаки образований правой доли печени метастатического характера (S7-S6 образование неоднородной пониженной плотности, без четких контуров, размерами 54 x 43 x 61 мм, неоднородно накапливающее контрастный препарат; в S8 — очаг пониженной плотности диаметром 9 мм, слабо накапливающий контрастный препарат). В сравнении с КТ ОБП от 25.11.2022, наблюдается положительная динамика. Оценку эффективности ТАХЭ проводят через месяц по КТ/МРТ с внутривенным контрастным усилением с использованием критериев RECIST 1.1 (2009 г.) (Response evaluation criteria in solid tumours), согласно которым был получен частичный ответ (регрессия): > 30% суммы наибольших размеров (длинных осей) очагов.

Через три месяца (14.05.2023) пациент вновь был госпитализирован для повторного проведения ТАХЭ, так как ранее был получен частичный ответ на комбинированную терапию. Прошел четыре курса ИТ. С учетом объема поражения печени, распространенности и положительной динамики процесса выполнена ТАХЭ: липиодол 20 мл + карбоплатин 450 мг. Артериальная эмболизация выполнена гемостатической губкой Cutanplast. Была назначена послеоперационная сопроводительная фармакотерапия. Больной выписан на седьмой день после проведения оперативного вмешательства, на момент выписки свое состояние оценивал как удовлетворительное, повышение температуры и болей в подреберье не отмечал.

По шкале общих терминологических критериев оценки нежелательных явлений Национального института рака (The National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events, NCI-CTCAE), в которой степени побочных нежелательных явлений варьируют от 0 (нормальный диапазон) до 4 и 5 (инвалидность или смерть соответственно), наблюдали лихорадку I степени, а также после проведения ТАХЭ в раннем послеоперационном периоде были отмечены умеренные боли в правом подреберье и эпигастрии (I степени).

На сегодняшний день длительность наблюдения составила 12 месяцев без признаков прогрессирования заболевания, пациент находится в удовлетворительном состоянии, ведет активный образ жизни и проходит курсы системной ИТ с июня 2023 г. по настоящее время (ноябрь 2023 г.) по схеме поддерживающей фазы: ниволумаб 3 мг/кг в/в капельно 1 раз в 14 дней.

## Обсуждение клинического случая

В ходе ТАХЭ по поводу метастатического поражения печени УМ с использованием карбоплатина и липиодола — вязкого этиодированного масла, которое избирательно доставляется через катетер, чтобы вызвать ишемический некроз опухоли за счет блокады артериального притока в опухоль (при этом здоровая паренхима печени сохраняется вследствие двойного кровоснабжения из воротной вены и печеночной артерии), в комбинации с постепенным высвобождением химиопрепарата в области метастаза и его селективным цитостатическим воздействием при минимальных системных побочных явлениях. Очевидно, что паллиативная химиотерапия требует более чем 70% больным со злокачественными опухолями печени. Однако эффективность системной химиотерапии при неоперабельном поражении не превышает 20–30% при выживаемости 3–4 месяца даже при использовании комбинаций нескольких препаратов. По всей видимости, при внутривенном введении химиопрепаратов терапевтическая концентрация достигается лишь на короткое время и не оказывает необходимого воздействия на опухолевые клетки, а выраженные нарушения детоксикационной функции печени ограничивают применение больших доз противоопухолевых средств. Иммуноterapia значительно улучшила прогноз у пациентов с меланомой кожи, но аналогичного клинического эффекта не наблюдают при метастатической УМ. Однако эффективность комбинированной иммунотерапии выше, чем при использовании других вариантов лекарственной терапии (монотерапии анти-PD-1, химиотерапии и др.) при УМ. Частичную резекцию печени можно рассматривать только у пациентов с хорошей функцией печени, во избежание потенциальной ее декомпенсации. Системная химиотерапия также имеет ограниченное применение у пациентов с нерезектабельными метастазами в печень. Поэтому для таких пациентов рекомендуют альтернативные методы лечения, такие как радиочастотная абляция и микроволновая абляция. Если ни хирургическое вмешательство, ни местные абляционные методы не дают результата, ТАХЭ — вариант местного контроля опухоли. Эта терапия показала многообещающие результаты у пациентов с неоперабельными метастазами в печени. Благодаря сочетанию прямого химиотерапевтического применения и техники окклюзии сосудов цитостатические вещества находятся в контакте с целевыми злокачественными клетками в течение более длительного периода времени.

Один из недостатков методики ТАХЭ — это формирование «гипоксического микроокружения»,

которое усиливает неангиогенез и тем самым может способствовать раннему прогрессированию. Общеизвестно, что ангиогенез — ключевой фактор роста и метастазирования опухолей при многих видах рака, включая и метастатический рак печени [9].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Особенности клинического течения УМ по сравнению с кожной формой заболевания заключаются в более продолжительном времени до прогрессирования и преимущественном метастазировании в печень, а также по молекулярно-генетическим свойствам (основные молекулярные нарушения, характерные для меланомы кожи (мутации BRAF, NRAS), не участвуют в запуске патологических процессов в УМ). Исходя из имеющихся данных, совместное применение ипилимумаба и ниволумаба представляет собой одну из основных схем для лечения данной группы пациентов. Новые комбинированные методы лечения, сочетающие ТАХЭ с иммунотерапией (в описанном нами клиническом наблюдении — применение ниволумаба + ипилимумаба), в лечении метастатического поражения печени УМ позволили контролировать течение заболевания на протяжении 12 месяцев. У пациента наблюдали положительную динамику в виде уменьшения размеров метастатических очагов, что не может не обнадеживать, так как минимальные значения медианы ОБ у данной категории больных при использовании ТАХЭ и отсутствии хирургического лечения превышены в 2 и 4 раза соответственно. Однако необходимы дополнительные исследования для определения оптимальной терапии с целью достижения максимальной эффективности и минимизации побочных эффектов. Проспективные рандомизированные исследования помогут в определении безопасности и эффективности комбинированной локорегиональной и системной терапии для лечения метастатической УМ. ТАХЭ — альтернативный метод лечения пациентов с нерезектабельными метастазами в печень, позволяющий избирательно доставлять высокие дозы химиотерапевтического агента в ложе опухоли и эмболизировать сосуды-мишени с наименьшей системной биодоступностью, что минимизирует системные побочные эффекты, сохраняя при этом окружающие ткани печени. Отсутствие эффективных методов лечения метастатического поражения печени УМ заставляет искать новые подходы к лечению данного заболевания. В связи с этим на сегодняшний день необходимо оптимизировать лечение из доступных методов, таких как системные (химиотерапия/иммунотерапия) и локальные (ТАХЭ и др.).

## Литература

- Carle X, Gastaud L, Salleron J, Tardy MP, Caujolle JP, Thyss A, et al. Optimizing the treatment of liver metastases from uveal melanomas with transarterial chemoembolization using melphalan and calibrated microspheres. *Bull Cancer*. 2020; 107 (12): 1274–83. DOI: 10.1016/j.bulcan.2020.09.010.
- Tao YX, Li HW, Luo JT, Li Y, Wei WB. Regional chemotherapy for uveal melanoma liver metastases. *Int J Ophthalmol*. 2023; 16 (2): 293–300. DOI: 10.18240/ijo.2023.02.18.
- Aronow ME, Topham AK, Singh AD. Uveal Melanoma: 5-Year Update on Incidence, Treatment, and Survival (SEER 1973–2013). *Ocul Oncol Pathol*. 2018; 4 (3): 145–51. DOI: 10.1159/000480640.
- Gonsalves CF, Adamo RD, Eschelmann DJ. Locoregional therapies for the treatment of uveal melanoma hepatic metastases. *Semin Intervent Radiol*. 2020; 37 (5): 508–17. DOI: 10.1055/s-0040-1720948.
- Sajan A, Fordyce S, Sideris A, Liou C, Toor Z, Filtes J, et al. Minimally invasive treatment options for hepatic uveal melanoma metastases. *Diagnostics (Basel)*. 2023; 13 (11): 1836. DOI: 10.3390/diagnostics13111836.
- Karivedu V, Eldessouki I, Taftaf A, Zhu Z, Makramalla A, Karim NA. Nivolumab and ipilimumab in the treatment of metastatic uveal melanoma: a single-center experience. *Case Rep Oncol Med*.

- 2019; 2019: 3560640. DOI: 10.1155/2019/3560640.
7. Назарова В. В., Орлова К. В., Утяшев И. А., Яровой А. А., Яровая В. А., Маркина И. Г. и др. Комбинированная иммунотерапия при метастатической увеальной меланоме. Опыт одного центра. Эффективная фармакотерапия. 2023; 19 (16): 64–71.
  8. Weber JS. Immunotherapy complete response data suggest metastatic melanoma cures. 2018 Aug 09. Available from: <https://www.medscape.com/viewarticle/900259?form=fpf>.
  9. Van Cutsem E, Paccard C, Chiron M, Tabernero J. Impact of Prior Bevacizumab Treatment on VEGF-A and PlGF Levels and Outcome Following Second-Line Aflibercept Treatment: Biomarker Post Hoc Analysis of the VELOUR Trial. *Clin Cancer Res.* 2020; 26 (3): 717–25. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1985.

## References

1. Carle X, Gastaud L, Salleron J, Tardy MP, Caujolle JP, Thyss A, et al. Optimizing the treatment of liver metastases from uveal melanomas with transarterial chemoembolization using melphalan and calibrated microspheres. *Bull Cancer.* 2020; 107 (12): 1274–83. DOI: 10.1016/j.bulcan.2020.09.010.
2. Tao YX, Li HW, Luo JT, Li Y, Wei WB. Regional chemotherapy for uveal melanoma liver metastases. *Int J Ophthalmol.* 2023; 16 (2): 293–300. DOI: 10.18240/ijo.2023.02.18.
3. Aronow ME, Topham AK, Singh AD. Uveal Melanoma: 5-Year Update on Incidence, Treatment, and Survival (SEER 1973-2013). *Ocul Oncol Pathol.* 2018; 4 (3): 145–51. DOI: 10.1159/000480640.
4. Gonsalves CF, Adamo RD, Eschelmann DJ. Locoregional therapies for the treatment of uveal melanoma hepatic metastases. *Semin Intervent Radiol.* 2020; 37 (5): 508–17. DOI: 10.1055/s-0040-1720948.
5. Sajjan A, Fordyce S, Sideris A, Liou C, Toor Z, Filtes J, et al. Minimally invasive treatment options for hepatic uveal melanoma metastases. *Diagnostics (Basel).* 2023; 13 (11): 1836. DOI: 10.3390/diagnostics13111836.
6. Karivedu V, Eldessouki I, Taftaf A, Zhu Z, Makramalla A, Karim NA. Nivolumab and Ipilimumab in the treatment of metastatic uveal melanoma: a single-center experience. *Case Rep Oncol Med.* 2019; 2019: 3560640. DOI: 10.1155/2019/3560640.
7. Nazarova VV, Orlova KV, Utyashev IA, Yarovoy AA, Yarovaya VA, Markina IG, et al. Combined Immunotherapy for Metastatic Uveal Melanoma. Single Centre Experience. *Effective Pharmacotherapy.* 2023; 19 (16): 64–71. Russian.
8. Weber JS. Immunotherapy complete response data suggest metastatic melanoma cures. 2018 Aug 09. Available from: <https://www.medscape.com/viewarticle/900259?form=fpf>.
9. Van Cutsem E, Paccard C, Chiron M, Tabernero J. Impact of Prior Bevacizumab Treatment on VEGF-A and PlGF Levels and Outcome Following Second-Line Aflibercept Treatment: Biomarker Post Hoc Analysis of the VELOUR Trial. *Clin Cancer Res.* 2020; 26 (3): 717–25. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1985.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ УСТРАНЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ ЧЕЛЮСТЕЙ

Г. В. Порядин, Д. А. Еремин, Н. М. Хелминская , В. И. Кравец, И. В. Житарева, А. В. Посадская, Н. М. Краснов, П. А. Шень, М. А. Гурешидзе  
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Методы регенеративной медицины в России и за рубежом активно развиваются в связи с актуальностью этого направления, особенно в вопросах костной пластики челюстей. Для нормализации и стимуляции остеогенеза традиционно применяют ауто-, алло- и ксенопластические материалы, а также синтетические препараты на основе кальций-фосфатной керамики, но результаты лечения не всегда однозначны. Целью исследования было обосновать применение биокомплекса плазмы крови, богатой факторами роста PRGF, и ксенопластического материала для повышения эффективности остеогенеза костных дефектов челюстей. В исследовании участвовало 136 пациентов (105 женщин и 31 мужчина, в возрасте 21–67 лет), в зависимости от метода замещения костного дефекта разделенных на четыре группы. В 1-й группе остеопластические материалы не применяли, во 2-й пластику проводили фибриновым гелем PRGF, в 3-й — материалом Osteobiol Gen-Os, в 4-й — материалом Osteobiol Gen-Os совместно с препаратом плазмы, богатой факторами роста PRGF. Для динамической оценки процесса остеогенеза проводили компьютерную томографию с цифровой денситометрией до операции и через 3, 6, 12 месяцев после нее. Через год восстановление утраченного объема костной ткани в 4-й группе зафиксировано у 100% пациентов, в 3-й — у 70,27%, во 2-й — у 43,47%, а в 1-й у — 37,5%, точный критерий Фишера выявил статистически значимые различия результатов костной пластики в 3-й и 4-й группах ( $p = 0,00002$ ). Статистически значимо различаются показатели плотности костной ткани у пациентов 1-й и 2-й групп через 12 месяцев после операции ( $p = 0,044$ ), у 3-й и 4-й групп — через 3 ( $p = 0,004$ ), 6 ( $p = 0,0001$ ) и 12 ( $p = 0,0001$ ) месяцев. Полученные результаты говорят об эффективности применения предложенной нами методики.

**Ключевые слова:** дефект челюсти, костная пластика, плазма, богатая факторами роста, ксенографт, остестимуляция, остеокондукция

**Вклад авторов:** В. И. Кравец, А. В. Посадская, Н. М. Краснов — концепция и дизайн исследования; П. А. Шень, М. А. Гурешидзе, Н. М. Краснов — курация пациентов и обработка данных; И. В. Житарева — статистическая обработка; Н. М. Краснов — подготовка черновика рукописи; Г. В. Порядин, Д. А. Еремин, Н. М. Хелминская — редактирование.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим кабинетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол №131 от 27 января 2014 г.), от пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Наталья Михайловна Хелминская  
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; Khelminskaya@mail.ru

**Статья получена:** 02.10.2023 **Статья принята к печати:** 17.10.2023 **Опубликована онлайн:** 21.11.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.044

## EFFICACY OF THE JAWBONE DEFECT ELIMINATION

Poryadin GV, Eremin DA, Khelminskaya NM , Kravets VI, Zhitareva IV, Posadskaya AV, Krasnov NM, Shen PA, Gureshidze MA  
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The regenerative medicine methods are being actively developed both in Russia and abroad due to relevance of this direction, especially in the field of the jaw osteoplasty. Autologous, allogeneic and xenoplastic materials, as well as the calcium phosphate ceramics synthetic preparations are conventionally used to normalize and stimulate osteogenesis, however, the treatment outcomes are not always unequivocal. The study was aimed to substantiate the use of the biocomplex consisting of plasma rich in growth factors (PRGF) and xenoplastic material to improve the jawbone osteogenesis efficacy. The study involved 136 patients (105 females and 31 males aged 21–67) divided into four groups based on the method of bone defect restoration. In group 1, no osteoplastic material was used; in group 2, osteoplasty involved the use of the PRGF fibrin gel; in group 3, the Osteobiol Gen-Os material was used; in group 4, osteoplasty involved using the combination of the Osteobiol Gen-Os material and plasma rich in growth factors (PRGF). Computed tomography and digital densitometry were performed before surgery and 3, 6, 12 months after it to assess the dynamics of osteogenesis. A year later restoration of the lost bone tissue volume was reported in 100% of patients in group 4, 70.27% of patients in group 3, 43.47% of patients in group 2, 37.5% of patients in group 1; Fisher's exact test revealed significant differences in the osteoplasty outcomes in groups 3 and 4 ( $p = 0.00002$ ). There were significant differences in bone density between patients of groups 1 and 2 twelve months after surgery ( $p = 0.044$ ), between patients of groups 3 and 4 three ( $p = 0.004$ ), six ( $p = 0.0001$ ) and 12 ( $p = 0.0001$ ) months after surgery. The findings show that the method proposed is effective.

**Keywords:** jaw defect, osteoplasty, plasma rich in growth factors, xenograft, osteostimulation, osteoconduction

**Author contribution:** Kravets VI, Posadskaya AV, Krasnov NM — study concept and design; Shen PA, Gureshidze MA, Krasnov NM — patient follow-up and data processing; Zhitareva IV — statistical processing; Krasnov NM — manuscript draft writing; Poryadin GV, Eremin DA, Khelminskaya NM — editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 131 of 27 January 2014), the patients submitted the informed consent to study participation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Natalia M. Khelminskaya  
Ostovitianov, 1, Moscow, 117997, Russia; Khelminskaya@mail.ru

**Received:** 02.10.2023 **Accepted:** 17.10.2023 **Published online:** 21.11.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.044

Особенности репаративной регенерации костных дефектов челюстей обусловлены прежде всего высокой контаминацией полости рта микроорганизмами. В 1 мл ротовой жидкости содержатся миллиарды микроорганизмов, образующих ассоциации, состоящие из различных видов бактерий — стрептококков, нейссерий, вибрионов, спирохет и спирохет, большая часть которых являются облигатными или факультативными анаэробами,

длительное время сохраняющими свою жизнеспособность и активно размножающимися [1].

Существенное влияние на процесс спонтанной регенерации костной ткани челюстей оказывает химический состав слюны, поскольку увеличение активности протеолитических ферментов и активаторов фибринолиза способствует растворению и вымыванию кровяного сгустка из полости дефекта, осложняя течение

послеоперационного периода и нарушая образование органотипичного регенерата костной ткани [2].

Некоторые клинические и экспериментальные исследования продемонстрировали, что после экстракции зубов на верхней и нижней челюсти происходит резорбция костной ткани лунки удаленного зуба, причем с щечной стороны убыль костной ткани выражена больше, чем с язычной и небной [3, 4]. Спустя 3 месяца после удаления зуба происходит потеря 2/3 объема костной ткани альвеолы [5]. Через полгода после операции средняя клиническая потеря ширины и высоты костной ткани лунки зуба составляет 63% и 22% от первоначального объема соответственно [4], поэтому многие клиницисты указывают на необходимость консервации альвеолярного отростка (части) после экстракции зубов различными остеопластическими материалами [6, 7].

Бактериальная обсемененность костного дефекта негативно влияет на регенерацию, извращая процесс остеорепарации, и как следствие, восполнения полноценного объема костной полости не происходит. Аналогичная картина наблюдается в проекции костных дефектов, их причина — доброкачественные новообразования челюстей, прорастание которых приводит к резорбции костной ткани и вызывает компрессию ветвей тройничного нерва, с характерной неврологической симптоматикой [8].

На сегодняшний день опубликовано множество исследований, в которых сообщается о хороших результатах спонтанного восстановления костных дефектов челюстей после энуклеации кистозных образований, в том числе в случаях больших дефектов [9–11]. Была проведена сравнительная оценка использования ксенографтов, аллотрансплантатов и синтетических материалов для сохранения объема альвеолярного отростка (части) челюстей за период в 25 лет. Компьютерный анализ полученных данных не выявил клинически значимой разницы применения различных по происхождению костнопластических материалов и барьерных мембран, используемых для сохранения альвеолярного отростка (части) челюстей. Кроме того, наличие послеоперационных осложнений значительно замедляло процесс репарации костной ткани и препятствовало образованию полноценного органотипичного регенерата [12]. Данные обстоятельства свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения способов стимуляции регенерации костной ткани различными материалами и их сочетанием и определения стандартизированных показаний для методов остеопластики.

Цель исследования — обосновать применение биокомплекса плазмы, богатой факторами роста, и остеопластического материала для повышения эффективности остеогенеза ограниченных костных дефектов челюстей.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Клинико-рентгенологическое исследование проведено на клинической базе Городской клинической больницы №1 имени Н. И. Пирогова Департамента здравоохранения города Москвы, кафедры челюстно-лицевой хирургии и стоматологии Института стоматологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова Министерства здравоохранения РФ в период с 2014 по 2022 г.

Для изучения динамики восстановления костной ткани челюстей осуществляли клинико-рентгенологическое

исследование и хирургическое лечение у 136 больных в возрасте от 21 до 67 лет, из них — 105 (77,2%) женщин и 31 (22,8%) мужчина. Критерии включения пациентов в исследование: наличие установленного диагноза — хронический периодонтит, периапикальный абсцесс со свищем, корневая киста, фолликулярная киста, киста резцового канала. Критерии исключения: сопутствующая патология в стадии декомпенсации, злокачественные новообразования любой стадии, а также в период ремиссии менее 5 лет, заболевания кровеносной системы, гепатит В и С, сахарный диабет, тромбоцитопения, генерализованный пародонтит средней и тяжелой степени тяжести. Критериями исключения также были беременность и перенесенное отсутствующее заболевание с осложнениями во время исследования. В 15 (11,03%) случаях зафиксирована резорбция стенок нижнечелюстного и резцового канала с развитием явлений невралгии ветвей тройничного нерва. Исходя из своего размера, костные полости были разделены на три подгруппы: малые, объемом до 1 см<sup>3</sup>, диагностировали в 52 (39%) случаях, средние, объемом до 2 см<sup>3</sup> включительно, наблюдали у 53 (38,2%) пациентов и большие, объемом более 2 см<sup>3</sup> — в 31 (22,8%) случае.

В зависимости от метода остеопластики челюстей сформированы клинические группы. В 1-й группе, 24 (17,65%) человек, происходило спонтанное восстановление костной ткани за счет заполнения полости сгустком крови, во 2-й группе 23 (16,91%) пациентам костный дефект заполняли препаратом плазмы крови, богатой факторами роста PRGF в виде геля. В 3-ю группу входило 37 (27,20%) больных, у 7 из которых зафиксирована резорбция стенок внутривисочных каналов и компрессия ветвей тройничного нерва. Костную пластику в данной группе проводили ксеногенным материалом Osteobiol Gen-Os (Tecnooss; Италия). Четвертая группа состояла из 53 пациентов, у 8 из которых наблюдали неврологическую симптоматику, связанную со сдавлением нижнего альвеолярного и носонейного нерва в нижнечелюстном и резцовом канале соответственно. Замещение дефектов челюстей в данной группе производили комплексом, состоящим из материала Osteobiol Gen-Os, и плазмой крови, богатой факторами роста PRGF. Комплекс был приготовлен путем полимеризации в жидкой фазе гранул ксеноматериала. Для декомпрессии сосудисто-нервного пучка и разобщения зоны аугментации от полости канала применяли в 4-й группе фибриновую мембрану PRGF. Для получения препарата плазмы крови, богатой факторами роста PRGF, использовали центрифугу PRGF Sistema IV (BTI Biotechnology Institute; Испания). Предоперационное стоматологическое обследование и лечение проводили согласно общим клиническим рекомендациям «Болезни периапикальных тканей» [13].

В послеоперационном периоде клинический осмотр пациентов проводили на 1, 3, 5, 7 сутки. Всем пациентам было рекомендовано проведение туалета полости рта растворами антисептиков, нанесение на область послеоперационной раны геля с антисептиком, применение методов локальной гипотермии оперированных участков в течение трех суток после хирургического вмешательства по 10–15 мин каждый час. Назначали антибактериальные препараты широкого спектра действия и нестероидные противовоспалительные препараты в средней терапевтической дозе. Швы снимали на 10–14 сутки после оперативного лечения.

Для изучения структуры челюстей и определения способности исследуемых материалов создавать

полноценный объем костной ткани использовали данные конусно-лучевой компьютерной томографии, которую проводили при помощи денсального компьютерного томографа Galileos (Sirona; Германия) или KaVo 3D eXam (KaVo; Корея) до начала лечения и через 3, 6, 12 месяцев после оперативного вмешательства. При помощи инструментов программ Galileos Viewer и Vidar Dicom Viewer 3.1 определяли форму, размер и локализацию дефектов, их связь со смежными анатомическими структурами, оценивали объем и плотность костной ткани челюстей в единицах Хаунсфилда.

Математическую и статистическую обработку полученных данных изучали при помощи программного пакета IBM SPSS Statistics 21.0, использовали модули: описательные статистики, *t*-критерий для независимых выборок (критерий Стьюдента), непараметрический критерий *U* Манна–Уитни для двух независимых выборок. Был также задействован интернет-ресурс «medstatistic.ru» (калькулятор). Использовали программы: анализ таблиц сопряженности с использованием критерия  $\chi^2$ , двусторонний точный критерий Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ динамики восстановления костной ткани челюстей через год после оперативного вмешательства позволил свидетельствовать, что лучшие результаты остеопластики были получены в 4-й группе, где восстановление утраченного объема костной ткани отмечено во всех 52 (100%) наблюдениях, в 3-й группе только в 26 (70,27%) случаях зафиксировано полноценное заполнение костной полости регенератом ( $p = 0,00002$ ;  $< 0,05$ ). В 1-й и 2-й группах полное восстановление отмечено только в области малых дефектов, в 9 (37,5%) случаях у пациентов 1-й группы, и в 10 (43,47%) — у больных 2-й группы, восполнения объема средних и больших по объему полостей не зафиксировано, также не найдено статистически достоверного преимущества одной из групп ( $p = 0,905$ ;  $> 0,05$  и  $p = 0,77$ ;  $> 0,05$ ). Однако во 2-й клинической группе исследования показатели радиоинтенсивности на 3, 6 и 12 месяц после оперативного пособия были немного выше.

Статистически значимые различия между показателями цифровой денситометрии у пациентов 1-й и 2-й групп отмечены через 12 месяцев после оперативного вмешательства ( $p = 0,044$ ;  $< 0,05$ ), и это свидетельствует о том, что применение препарата крови PRGF в виде геля достоверно улучшает качественные показатели восстановления костной ткани. У больных 4-й клинической группы через три месяца после оперативного вмешательства средние показатели плотности костной ткани челюстей составили  $721,73 \pm 24,41$  HU, в 3-й группе — оказались значительно ниже:  $445,11 \pm 7,92$  HU ( $p = 0,004$ ;  $< 0,005$ ). Спустя 6 месяцев разница между средними показателями радиоинтенсивности костной ткани уменьшилась, значения для 3-й группы находились в диапазоне  $600,54 \pm 11,68$  HU, для 4-й —  $843,58 \pm 19,7$  HU,

однако статистически значимые различия сохранялись ( $p = 0,0001$ ;  $< 0,05$ ). Через год после хирургического вмешательства среднее значение плотности костной ткани у пациентов 3-й контрольной клинической группы существенно не изменилось и составило  $608,95 \pm 18,71$  HU, в 4-й группе данный показатель немного увеличился —  $898,64 \pm 20,18$  HU, и продолжал статистически отличаться ( $p = 0,0001$ ;  $< 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В хирургической практике «золотым стандартом» костной пластики считается аутоостеопластика, однако для замещения средних и больших костных дефектов, когда требуется большой объем костного материала, активно используют аллогенную кость, ксенографты и синтетические материалы [14–18]. Хорошие результаты остеопластики костных дефектов челюстей получены после применения препаратов плазмы крови, обогащенных тромбоцитами и факторами роста аутогенного и аллогенного происхождения [19–22]. Результаты рандомизированного контролируемого исследования, в котором проводили сравнительный анализ репарации костной ткани после применения остеопластических материалов ксеногенного и аллогенного происхождения, а также плазмы крови, богатой тромбоцитами, показали статистически достоверное преимущество применения препарата плазмы крови над другими исследуемыми материалами [23]. Многие авторы указывают на необходимость комбинирования различных по происхождению материалов для усиления регенераторного потенциала аугментата [24–28].

## ВЫВОДЫ

Сравнительный анализ динамики изменения объема и плотности костной ткани в проекции ограниченных дефектов во всех клинических группах продемонстрировал преимущество использования биокомплекса из костного материала Osteobiol Gen-Os и плазмы, богатой факторами роста PRGF, над традиционным методом, который использовали в 1-й контрольной группе, и над методиками раздельного применения Osteobiol Gen-Os и плазмы, богатой факторами роста PRGF, в виде геля. Простота и доступность метода приготовления препарата плазмы крови PRGF при относительно низкой себестоимости, полная биологическая безопасность и отсутствие токсического воздействия на организм делают данный способ одним из методов для решения вопросов регенеративной медицины. Полученные результаты исследования на основании информативных клинорентгенологических данных показали, что предложенная нами методика применения костнопластического материала Osteobiol Gen-Os в сочетании с плазмой, богатой факторами роста PRGF, перспективна для повседневного использования в практическом здравоохранении.

## Литература

1. Зеленова Е. Г., Заславская М. И., Салина Е. В., Рассанов С. П. Микрофлора полости рта: норма и патология: Учебное пособие. Нижний Новгород: Издательство НГМА, 2004; 158 с.
2. Самойлова М. В., Косырева Т. Ф., Анурова А. Е., Абрамович

- Р. А., Миронов А. Ю., Жиленкова О. Г. и др. Оценка микробиоценоза полости рта на основе гх-мс-определения плазмалогена и бактериального эндотоксина в ротовой жидкости. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64

- (3): 186–92. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-3-186-192.
3. Cardaropoli G, Araújo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced —augmented and non-augmented — defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005 May; 32 (5): 435–40. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2005.00692.x. PMID: 15842256.
  4. Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2009 Dec; 36 (12): 1048–58. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2009.01482.x. PMID: 19929956.
  5. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005 Feb; 32 (2): 212–8. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2005.00642.x. PMID: 15691354.
  6. Canullo, L, Del Fabbro M, Khijmatgar S, et al. Dimensional and histomorphometric evaluation of biomaterials used for alveolar ridge preservation: a systematic review and network meta-analysis. *Clin Oral Invest.* 2022; 26: 141–58. DOI: 10.1007/s00784-021-04248-1.
  7. Stumbras A, Januzis G, Kubilius R, Gervickas A, Juodzbaly G. Randomized clinical trial of bone healing after alveolar ridge preservation using xenografts and allografts vs. plasma rich in growth factors. *Journal of Oral Implantology.* 2020; 46 (5). DOI: 10.1563/aaid-joi-D-19-00179.
  8. Ku JK, Han M, Yongvikul A, Huh JK, Kim JY. Volumetric analysis of spontaneous bone healing after jaw cyst enucleation. *Sci Rep.* 2022 Sep 2; 12 (1): 14953. DOI: 10.1038/s41598-022-16921-w. PMID: 36056044. PMCID: PMC9440199.
  9. Chiapasco M, Rossi A, Motta JJ, Crescentini M. Spontaneous bone regeneration after enucleation of large mandibular cysts: A radiographic computed analysis of 27 consecutive cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58: 942–8. DOI: 10.1053/joms.2000.8732.
  10. Iatrou I, Theologie-Lygidakis N, Leventis M. Intraosseous cystic lesions of the jaws in children: a retrospective analysis of 47 consecutive cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2009; 107 (4): 485–92.
  11. Ihan Hren N, Miljavec M. Spontaneous bone healing of the large bone defects in the mandible. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2008; 37 (12): 1111–6. DOI: 10.1016/j.jom.2008.07.008.
  12. Atieh MA, Alsabeeha NH, Payne AG, Ali S, Faggion CMJ, Esposito M. Interventions for replacing missing teeth: alveolar ridge preservation techniques for dental implant site development. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021; 4: CD010176. DOI: 10.1002/14651858.
  13. Болезни периапикальных тканей. Общие клинические рекомендации. Постановление №18 Совета Ассоциации общественных объединений «Стоматологическая Ассоциация России» от 02.08.2018; 128 с.
  14. Дробышев А. Ю., Редько Н. А., Свиридов Е. Г., Деев Р. В. Особенности регенерации костной ткани альвеолярного гребня челюстей при применении материала на основе гидроксиапатита. *Травматология и ортопедия России.* 2021; 27 (1): 9–18. DOI: 10.21823/2311-2905-2021-27-1-9-18.
  15. Моисеева Н. С., Харитонов Д. Ю., Харитонов И. Д., Степанов И. В., Подопригора А. В. Клинико-лабораторная оценка морфологических параметров остеопластических материалов, применяемых при костной аугментации альвеолярного отростка. *Вестник новых медицинских технологий.* 2021; 15(4): 18–23. DOI: 10.24412/2075-4094-2021-4-1-3.
  16. Стогов М. В., Дюрягина О. В., Силантьева Т. А., Киреева Е. А., Шипицына И. В., Степанов М. А. Доклиническая оценка эффективности и безопасности нового костнопластического материала ксеногенного происхождения, содержащего в своем объеме ванкомицин и меропенем. *Гений ортопедии.* 2022; 28 (4): 565–73. DOI: 10.18019/1028-4427-2022-28-4-565-573.
  17. Han JJ, Moon JE, Lee E-H, Yang HJ, Hwang SJ. Clinical and Radiographic Outcomes of Dental Implant after Maxillary Sinus Floor Augmentation with RhBMP-2/Hydroxyapatite Compared to Deproteinized Bovine Bone. *PLOS ONE.* 2022; 17: e0273399. DOI: 10.1371/journal.pone.0273399.
  18. Ho SKC, Peel SAF, Hu ZM, Sándor GKB, Clokie CML. Augmentation of the Maxillary Sinus: Comparison of Bioimplants Containing Bone Morphogenetic Protein and Autogenous Bone in a Rabbit Model. *J Can Dent Assoc.* 2010; 76: 108.
  19. Блаженко А. Н., Родин И. А., Понкина О. Н., Муханов М. Л., Самойлова А. С., Веревкин А. А. и др. Влияние А-PRP-терапии на репаративную регенерацию костной ткани при свежих переломах костей конечностей. *Инновационная медицина Кубани.* 2019; 3 (15): 32–8.
  20. Бурыкин К. И., Паршиков М. В., Ярыгин Н. В., Светлов Д. В., Говоров М. В., Чемянов И. Г. и др. Возможности и перспективы использования обогащенной тромбоцитами плазмы в лечении переломов и дефектов костей. *Политравма.* 2020; 3: 108–19.
  21. Самодай В. Г. Стариков А. О. Калашников П. И. Лиофилизированные аллогенные факторы роста в травматологии и ортопедии как перспективное направление регенеративной медицины. *Политравма.* 2019; 4: 15–28.
  22. Файн А. М., Ваза А. Ю., Гнетцкий С. Ф., Скуратовская К. И., Бондарев В. Б., Боголюбский Ю. А. и др. Доступные способы повышения регенераторного потенциала пластического материала в неотложной травматологии. Часть 1. Использование аутологичной богатой тромбоцитами плазмы крови. *Трансплантология.* 2022; 14 (1): 79–97. DOI: 10.23873/2074-0506-2022-14-1-79-97.
  23. Skwarcz S, Bryzek I, Gregosiewicz A, Warda E, Gaweda K, Tarczynska M, et al. Autologous activated platelet-rich plasma (PRP) in bone tissue healing - does it work? Assessment of PRP effect on bone defect healing in animal models. *Polish Journal of Veterinary Sciences.* 2019; 22 (1): 109–15. DOI: 10.24425/pjvs.2019.127077.
  24. Васильев А. В., Кузнецова В. С., Галицына Е. В., Бухарова Т. Б., Осидак Е. О., Фатхудинова Н. Л., и др. Биосовместимость и остеогенные свойства коллаген-фибронектинового гидрогеля, импрегнированного BMP-2. *Стоматология.* 2019; 98 (6–2): 5–11. DOI: 10.17116/stomat2019980625.
  25. Конев В. А., Лабутин Д. В., Божкова С. А. Экспериментальное обоснование клинического применения стимуляторов остеогенеза в травматологии и ортопедии (обзор литературы). *Сибирское медицинское обозрение.* 2021; 4: 5–17. DOI: 10.20333/25000136-2021-4-5-17.
  26. Кузнецова В. С., Васильев А. В., Бухарова Т. Б., Недорубова И. А., Гольдштейн Д. В., Кулаков А. А. Преимущества и недостатки костно-пластических материалов, активированных BMP-2 и несущими его ген конструкциями. *Стоматология.* 2023; 102 (4): 76–80. DOI: 10.17116/stomat202310204176.
  27. Петров И. Ю., Ларионов Е. В., Ипполитов Ю. А., Бут Л. В., Петров А. И. Морфогистохимические исследования остеопластического материала на основе гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и недеминерализованного костного коллагена для восстановления костных дефектов в эксперименте. *Вестник новых медицинских технологий.* 2018; 3: 41–6. DOI: 10.24411/2075-4094-2018-16038.
  28. Skwarcz S, Bryzek I, Gregosiewicz A, Warda E, Gaweda K, Tarczynska M, et al. The effect of activated platelet-rich plasma (PRP) on tricalcium hydroxyapatite phosphate healing in experimental, partial defects of long bone shafts in animal models. *Polish Journal of Veterinary Sciences.* 2019; 22 (2): 243–50. DOI: 10.24425/pjvs.2019.127092.

## References

1. Zelenova EG, Zaslavskaya MI, Salina EV, Rassanov SP. Mikroflora polosti rta: norma i patologiya: Uchebnoe posobie. Nizhny Novgorod: Izdatel'stvo NGMA, 2004; 158 s. Russian.
2. Samoylova MV, Kosyreva TF, Anurova AE, Abramovich RA, Mironov AYU, Zhilenkova OG, et al. Oral cavity microbiocenosis assessment on the basis of bacterial endotoxin and plasmalogens

- in a saliva by method gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2019; 64 (3): 186–92. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-3-186-192. Russian.
3. Cardaropoli G, Araújo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced — augmented and non-augmented — defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005 May; 32 (5): 435–40. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2005.00692.x. PMID: 15842256.
  4. Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2009 Dec; 36 (12): 1048–58. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2009.01482.x. PMID: 19929956.
  5. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005 Feb; 32 (2): 212–8. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2005.00642.x. PMID: 15691354.
  6. Canullo L, Del Fabbro M, Khijmatgar S, et al. Dimensional and histomorphometric evaluation of biomaterials used for alveolar ridge preservation: a systematic review and network meta-analysis. *Clin Oral Invest*. 2022; 26: 141–58. DOI: 10.1007/s00784-021-04248-1.
  7. Stumbras A, Januzis G, Kubilius R, Gervickas A, Juodzbalsys G. Randomized clinical trial of bone healing after alveolar ridge preservation using xenografts and allografts vs. plasma rich in growth factors. *Journal of Oral Implantology*. 2020; 46 (5). DOI: 10.1563/aaid-joi-D-19-00179.
  8. Ku JK, Han M, Yongvikul A, Huh JK, Kim JY. Volumetric analysis of spontaneous bone healing after jaw cyst enucleation. *Sci Rep*. 2022 Sep 2; 12 (1): 14953. DOI: 10.1038/s41598-022-16921-w. PMID: 36056044. PMCID: PMC9440199.
  9. Chiapasco M, Rossi A, Motta JJ, Crescentini M. Spontaneous bone regeneration after enucleation of large mandibular cysts: A radiographic computed analysis of 27 consecutive cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000; 58: 942–8. DOI: 10.1053/joms.2000.8732.
  10. Iatrou I, Theologie-Lygidakis N, Leventis M. Intraosseous cystic lesions of the jaws in children: a retrospective analysis of 47 consecutive cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2009; 107 (4): 485–92.
  11. Ihan Hren N, Miljavec M. Spontaneous bone healing of the large bone defects in the mandible. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 2008; 37 (12): 1111–6. DOI: 10.1016/j.ijom.2008.07.008.
  12. Attieh MA, Alsabeeha NH, Payne AG, Ali S, Faggion CMJ, Esposito M. Interventions for replacing missing teeth: alveolar ridge preservation techniques for dental implant site development. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021; 4: CD010176. DOI: 10.1002/14651858.
  13. Bolezni periapikal'nykh tkaney. Obshchie klinicheskie rekomendatsii. Postanovlenie №18 Soveta Assotsiatsii obshchestvennykh ob"edineniy «Stomatologicheskaya Assotsiatsiya Rossii» ot 02.08.2018; 128 s. Russian.
  14. Drobyshev AYU, Redko NA, Sviridov EG, Deev RV. Features of bone regeneration of the jaws alveolar ridge using hydroxyapatite-based material. *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2021; 27 (1): 9–18. DOI: 10.21823/2311-2905-2021-27-1-9-18. Russian.
  15. Moiseeva NS, Kharitonov DYU, Kharitonov ID, Stepanov IV, Podoprigora AV. Clinical and laboratory evaluation of morphological parameters in osteoplastic materials used in alveolar bone augmentation. *Journal of new medical technologies*. 2021; 15(4): 18–23. DOI: 10.24412/2075-4094-2021-4-1-3. Russian.
  16. Stogov MV, Dyuryagina OV, Silanteva TA, Kireeva EA, Shipitsyna IV, Stepanov MA. Preclinical evaluation of the efficacy and safety of a new osteoplastic material of xenogenic origin containing vancomycin or meropenem. *Orthopaedic Genius*. 2022; 28 (4): 565–73. DOI: 10.18019/1028-4427-2022-28-4-565-573. Russian.
  17. Han JJ, Moon JE, Lee E-H, Yang HJ, Hwang SJ. Clinical and Radiographic Outcomes of Dental Implant after Maxillary Sinus Floor Augmentation with RhBMP-2/Hydroxyapatite Compared to Deproteinized Bovine Bone. *PLOS ONE*. 2022; 17: e0273399. DOI: 10.1371/journal.pone.0273399.
  18. Ho SKC, Peel SAF, Hu ZM, Sándor GKB, Clokie CML. Augmentation of the Maxillary Sinus: Comparison of Biomaterials Containing Bone Morphogenetic Protein and Autogenous Bone in a Rabbit Model. *J Can Dent Assoc*. 2010; 76: 108.
  19. Blazhenko AN, Rodin IA, Ponkina ON, Mukhanov ML, SamoiloVA AS, Verevkin AA, et al. Aim To evaluate the effect of A-PRP-therapy on reparative bone regeneration in acute limb bone fractures. *Innovative Medicine of Kuban*. 2019; 3 (15): 32–8. Russian.
  20. Burykin KI, Parshikov MV, Yarygin NV, Svetlov DV, Govorov MV, Chemyanov IG, et al. Opportunities and prospects for the use of plasma enriched in platelets in the treatment of fractures and bone defects. *Polytrauma*. 2020; 3: 108–19. Russian.
  21. Samoday VG, Starikov AO, Kalashnikov PI. Lyophilized allogenic growth factors in traumatology and orthopedics as a promising direction of regenerative medicine. *Polytrauma*. 2019; 4: 15–28. Russian.
  22. Fayn AM, Vaza AYU, Gnetetskiy SF, Skuratovskaya KI, Bondarev VB, Bogolyubskiy YuA, et al. Available methods to enhance regenerative potential of plastic materials for bone defects replacement in orthopedics. Part 1. Autologous platelet rich plasma. *The Russian Journal of Transplantation*. 2022; 14 (1): 79–97. DOI: 10.23873/2074-0506-2022-14-1-79-97. Russian.
  23. Skwarcz S, Bryzek I, Gregosiewicz A, Warda E, Gaweda K, Tarczynska M, et al. Autologous activated platelet-rich plasma (PRP) in bone tissue healing - does it work? Assessment of PRP effect on bone defect healing in animal models. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2019; 22 (1): 109–15. DOI: 10.24425/pjvs.2019.127077.
  24. Vasilyev AV, Kuznetsova VS, Galitsyna EV, Bukharova TB, Osidak EO, Fatkhudinova NL, et al. Biocompatibility and osteoinductive properties of collagen and fibronectin hydrogel impregnated with rhBMP-2. *Stomatology*. 2019; 98 (6–2): 5–11. DOI: 10.17116/stomat2019980625. Russian.
  25. Konev VA, Labutin DV, Bozhkova SA. Experimental justification for clinical application of bone growth stimulators in traumatology and orthopaedics (a review). *Siberian Medical Review*. 2021; 4: 5–17. DOI: 10.20333/25000136-2021-4-5-17. Russian.
  26. Kuznetsova VS, Vasilyev AV, Bukharova TB, Nedorubova IA, Goldshtein DV, Kulakov AA. Advantages and disadvantages of bone graft materials activated by BMP-2 and constructs carrying its gene. *Stomatology*. 2023; 102 (4): 76–80. DOI: 10.17116/stomat202310204176. Russian.
  27. Petrov IYu, Larionov EV, Ippolitov YuA, But LV, Petrov AI. Morphohistochemical studies of osteoplastic material based on hyaluronic acid, hondroitinsulfate and under-mineralized bone collagen for bone defects recovery in experiment. *Journal of new medical technologies*. 2018; 3: 41–6. DOI: 10.24411/2075-4094-2018-16038. Russian.
  28. Skwarcz S, Bryzek I, Gregosiewicz A, Warda E, Gaweda K, Tarczynska M, et al. The effect of activated platelet-rich plasma (PRP) on tricalcium hydroxyapatite phosphate healing in experimental, partial defects of long bone shafts in animal models. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2019; 22 (2): 243–50. DOI: 10.24425/pjvs.2019.127092.

## ПРЕДОПЕРАЦИОННОЕ ПЛАНИРОВАНИЕ АРТРОПЛАСТИКИ ТАЗОБЕДРЕННОГО СУСТАВА

Б. Ш. Минасов, Р. Р. Якупов, А. Р. Билялов, Т. Б. Минасов, М. М. Валеев, Т. Р. Мавлютов, И. Э. Нигамедзянов, В. Н. Акбашев ✉, К. К. Каримов

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

Предоперационное планирование артропластики ТБС предоставляет хирургам уникальную возможность тщательного изучения анатомии пациента, позволяет определить оптимальный размер, позиционирование импланта, а также предупредить потенциальные осложнения. Развитие цифровых технологий позволяет повысить возможности предоперационного планирования за счет использования трехмерного моделирования. Цель: провести сравнение точности трехэтапного предоперационного планирования артропластики ТБС по сравнению со стандартным методом. В исследование было включено 224 пациента с различными формами дегенеративно-дистрофических заболеваний ТБС, которые были разделены на основную и контрольную группу в зависимости от метода планирования. В группе исследования предоперационное планирование артропластики проводилось в три этапа: оценка плотности костной ткани в области опорных зон на основании КТ-томографии; виртуальное проектирование с использованием автоматизированных программ; изготовление 3D-модели на основе компьютерного моделирования. В группе сравнения использовали рентгенограммы и шаблоны эндопротеза. Результаты показали, что статистически значимой разницы между методами планирования не было у пациентов, страдающих остеоартрозом и аваскулярным некрозом головки бедра ( $p > 0,05$ ), в отличие от группы с посттравматической патологией ТБС, у которой отмечалась статистически значимая разница ( $p_c = 0,002$ ). Выводы: алгоритм трехэтапной методики предоперационного планирования артропластики ТБС показал более высокую эффективность для пациентов с различной нозологической формой дегенеративно-дистрофических заболеваний ТБС по сравнению со стандартным методом.

**Ключевые слова:** эндопротезирование тазобедренного сустава, артропластика, предоперационное планирование, объемное моделирование, 3D-печать

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке гранта Правительства Республики Башкортостан для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых, в рамках программы Евразийского НОЦ; и при поддержке Программы стратегического академического лидерства Башкирского государственного медицинского университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

**Вклад авторов:** Б. Ш. Минасов, Р. Р. Якупов, А. Р. Билялов — разработка дизайна исследования, анализ результатов; Т. Б. Минасов, М. М. Валеев, Т. Р. Мавлютов — интраоперационный контроль определения размеров компонентов эндопротеза, сбор данных, анализ результатов; И. Э. Нигамедзянов, В. Н. Акбашев, К. К. Каримов — статистический анализ, оценка результатов, обзор литературы, компьютерное, объемное моделирование, 3D-печать костей таза, вертлужного и бедренного компонентов эндопротеза.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом БГМУ (протокол № 11 от 15 ноября 2023 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Владислав Николаевич Акбашев  
ул. Ленина, д. 3., 450008, г. Уфа, Россия; Vlad-akb@mail.ru

**Статья получена:** 12.11.2023 **Статья принята к печати:** 19.12.2023 **Опубликована онлайн:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.052

## PREOPERATIVE PLANNING OF HIP ARTHROPLASTY

Minasov BSh, Yakupov RR, Bilyalov AR, Minasov TB, Valeev MM, Mavlyutov TR, Nigamedzanov IE, Akbashev VN ✉, Karimov KK

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Preoperative planning of hip arthroplasty provides surgeons with a unique opportunity of thorough investigation of the patient's anatomy, allows them to determine optimal implant size and position, as well as to prevent potential complication. Advances in digital technology enable expansion of opportunities of preoperative planning due to using three-dimensional modeling. The study was aimed to compare precision of the three-step preoperative planning of hip arthroplasty and the standard method. Methods: The study involved 224 patients with various forms of degenerative and dystrophic diseases of the hip joint, who were divided into the index and control groups based on the planning method. In the index group, preoperative planning of arthroplasty was conducted in three steps: assessment of bone density in the zones of fixation based on CT; virtual design involving the use of automated programs; 3D model construction based on the computer model. X-ray images and endoprosthesis templates were used in the comparison group. The results showed that there were no significant differences between planning methods in patients with osteoarthritis and avascular necrosis of the femoral head ( $p > 0.05$ ), in contrast to the group with traumatic hip joint pathology showing significant differences ( $p_c = 0.002$ ). Conclusions: the three-step algorithm for preoperative planning of hip arthroplasty showed higher efficacy in patients with various nosological forms of degenerative and dystrophic diseases of the hip joint compared to the standard method.

**Keywords:** hip replacement, arthroplasty, preoperative planning, volumetric modeling, 3D printing

**Funding:** the study was supported by grant of the Government of the Republic of Bashkortostan for state support of scientific research guided by the leading scientists within the framework of the Eurasian Research and Educational Center programs; it was also supported by the Strategic Academic Leadership Program of the Bashkir State Medical University (PRIORITY-2030).

**Author contribution:** Minasov BSh, Yakupov RR, Bilyalov AR — developing the study design, data analysis; Minasov TB, Valeev MM, Mavlyutov TR — intraoperative control of determining the size of the endoprosthesis components, data acquisition, data analysis; Nigamedzanov IE, Akbashev VN, Karimov KK — statistical analysis, data estimation, literature review, computer, volumetric modeling, 3D printing of pelvic bones, acetabular and femoral components of the endoprosthesis.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Bashkir State Medical University (protocol № 11 dated 15 November 2023)

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladislav N. Akbashev  
Lenina, 3, 450008, Ufa, Russia; Vlad-akb@mail.ru

**Received:** 12.11.2023 **Accepted:** 19.12.2023 **Published online:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.052

В последние десятилетия объемы оказания высокотехнологичной медицинской помощи в области травматологии и ортопедии существенно возросли, в том числе вмешательства по эндопротезированию крупных суставов нижних конечностей — тазобедренного и/или коленного сустава [1]. Тотальное эндопротезирование тазобедренного сустава (ТБС) — стандартная хирургическая процедура для лечения тяжелой патологии [2]. Основной целью эндопротезирования является уменьшение боли и восстановление функции нижней конечности, что позволяет пациенту вернуться к активной деятельности и улучшить качество жизни. При тотальном эндопротезировании ТБС вертлужный компонент и ножка эндопротеза должны иметь соответствующий размер и положение компонентов, что необходимо для достижения хороших функциональных результатов и долгосрочности службы протеза. Однако при неправильном позиционировании или определении размеров компонентов эндопротеза увеличивается риск развития интра- и послеоперационных осложнений, таких как удлинение или укорочение конечности, интраоперационные переломы, асептическое расшатывание, вывих головки эндопротеза и т. д. [3]. Все это способствует развитию послеоперационного болевого синдрома в области оперированного сустава, нестабильности и преждевременному износу компонентов эндопротеза, что приводит к неудовлетворенности пациента и снижению его качества жизни [4]. При любом эндопротезировании необходимо предоперационное планирование и интраоперационный контроль. Предоперационное планирование имеет первостепенное значение для оптимизации результатов при эндопротезировании ТБС. Оно помогает хирургу визуализировать окончательное положение имплантата после тщательного изучения клинических и рентгенографических данных [5]. В случае первичного эндопротезирования предоперационное планирование можно провести при помощи стандартных рентгенограмм, шаблонов (2D) или при помощи соответствующего программного обеспечения. При первичном эндопротезировании, когда оперативному вмешательству предшествовали травмы, остеотомии, операции, проведение предоперационного планирования затруднено в связи с нарушением рентгенанатомических критериев.

В качестве традиционного метода предоперационного планирования эндопротезирования ТБС используют стандартную рентгенограмму ТБС с наложением на нее шаблонов эндопротеза для точного определения размеров вертлужного и бедренного компонента эндопротеза, а также их позиционирования.

Трехмерное планирование позволяет более четко определить уникальные анатомические особенности и ориентиры пациента, а также обеспечивает оптимальную визуализацию для предоперационного определения размера имплантата. Методы 3D-планирования позволяют более точно определить размер вертлужного компонента и ножки эндопротеза (96–100%), по сравнению с 2D-шаблонами (16–43%). Результаты подтверждают превосходство 3D-методов над 2D-шаблонами в точности определения размеров имплантатов. Данные компьютерной томографии 3D-планирования являются привлекательной альтернативой навигации для восстановления длины и оси конечности [6–9].

Отсутствие единых подходов к планированию оперативного лечения не позволяет получать идентичные

результаты лечения в аналогичных клинических ситуациях и необходимо создание определенного алгоритма предоперационного планирования для выбора тактики лечения при той или иной патологии сустава.

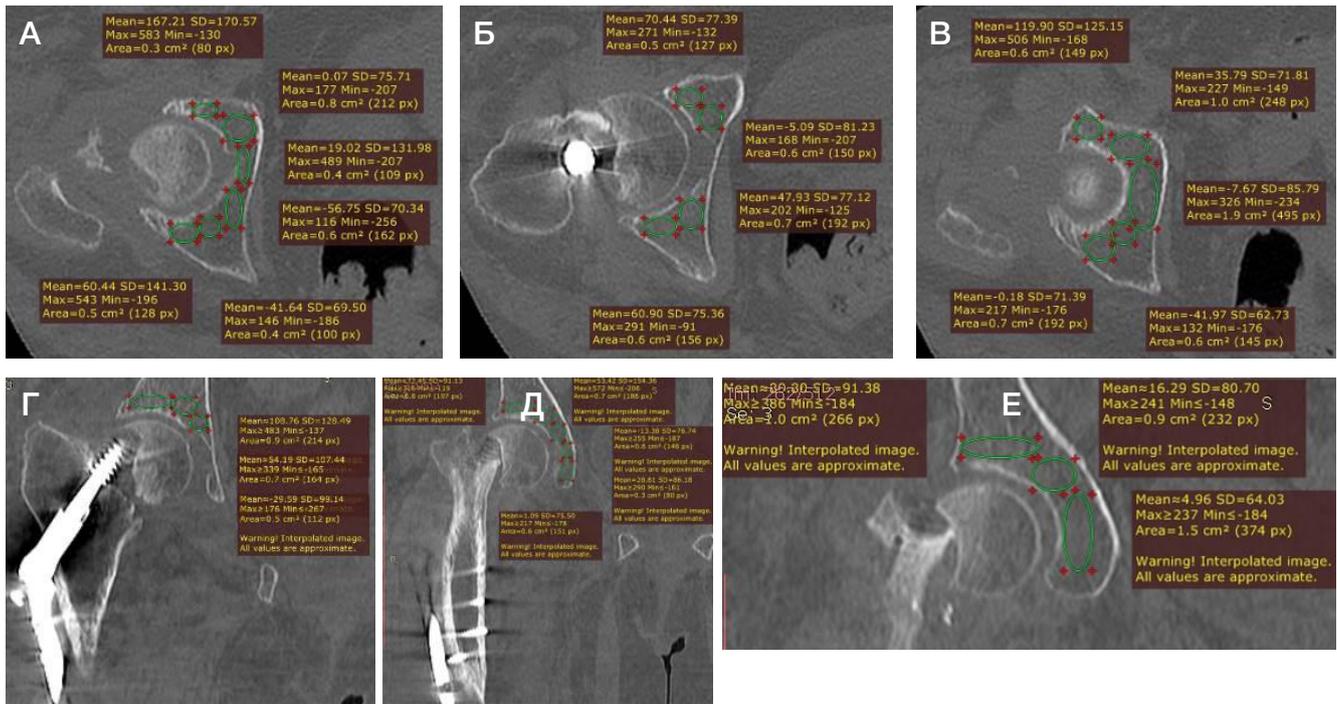
Целью данного исследования является проведение анализа эффективности трехэтапного предоперационного планирования артропластики ТБС в зависимости от нозологической формы дегенеративно-дистрофических заболеваний ТБС по сравнению со стандартным методом.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Был проведен сравнительный анализ оценки результатов различных методов предоперационного планирования эндопротезирования ТБС. В исследовании приняли участие 224 пациента. Критерии включения пациентов в исследование: наличие первичного (идиопатического) остеоартроза ТБС III–IV стадии (по классификации Kellgren & Lawrence) с нарушением функции сустава III степени и более; наличие асептического некроза головки бедренной кости II–III и наличие выраженного болевого синдрома; посттравматическая патология (состояние после остеосинтеза проксимального отдела бедра или вертлужной впадины в связи с переломом данных сегментов) с развитием осложнений в виде посттравматического остеоартроза или ложного сустава и нуждающиеся в артропластике ТБС. Диагноз был установлен на основании клинико-анамнестических данных, а также с использованием дополнительных инструментальных методов исследования (рентгенографии, компьютерной и магнитно-резонансной томографии). Критерии исключения: наличие инфекционно-воспалительных заболеваний пораженного сегмента; наличие сопутствующих соматических заболеваний, которые являлись абсолютным противопоказанием к проведению операции; отсутствие добровольного согласия пациента, возраст моложе 18 лет. Всех пациентов разделили на две группы: группа исследования (116 человек) и группа сравнения (108 человек). В группе исследования было выделено три подгруппы: 34 пациента с остеоартрозом (средний возраст  $60,8 \pm 7,2$ ), 30 пациентов с аваскулярным некрозом головки бедра (средний возраст  $43,9 \pm 7,9$  лет), 52 пациента с посттравматической патологией ТБС (этой группе пациентов был выполнен остеосинтез вследствие перелома: шейки, вертельной зоны бедра, вертлужной впадины таза и т. п.) ( $60,2 \pm 11,1$  лет). Группа сравнения также была разделена на три подгруппы: 33 пациента с остеоартрозом (средний возраст  $61,3 \pm 6,8$ ), 29 пациентов с аваскулярным некрозом головки бедра ( $42,6 \pm 8,4$  года), 46 пациентов с посттравматической патологией ТБС ( $59,3 \pm 12,7$  года). Средний возраст пациентов среди всех исследуемых был равен  $57 \pm 6,2$  года, женщины составили 119 человек (53,12%), мужчины 105 человек (46,87%).

В группе исследования ( $n = 116$ ) предоперационное планирование артропластики ТБС проводили в три этапа.

На первом этапе в области вертлужной впадины и бедра на основе компьютерной томографии (КТ) ТБС определяли плотности кости в трех плоскостях по шкале Хаунсфилда. Плотность оценивали по всему периметру опорных зон с учетом планируемого места расположения и установки имплантата. Важным критерием установки и позиционирования эндопротеза было определение зоны с оптимальной плотностью костной ткани, а также участков со сниженной плотностью, остеосклерозом, кистами и различными дефектами. При проведении



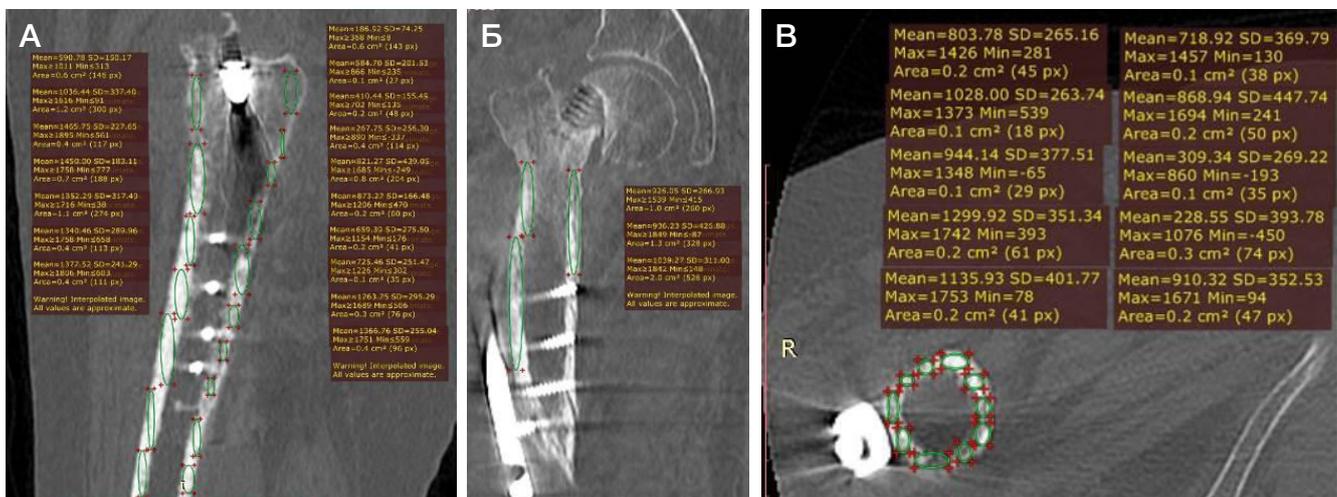
**Рис. 1.** Определение плотности опорных зон кости в области вертлужной впадины на основе КТ пациента 73 лет в горизонтальной (А, Б, В) и фронтальной (Г, Д, Е) проекциях: на уровне нижнего отдела вертлужной впадины (А); на уровне среднего отдела вертлужной впадины (Б); на уровне верхнего отдела вертлужной впадины (В) (Общее среднее значение плотности по шкале Хаунсфилда — 30,65 HU); на уровне заднего отдела вертлужной впадины (Г); на уровне среднего отдела вертлужной впадины (Д); на уровне переднего отдела вертлужной впадины (Е). (Общее среднее значение плотности по шкале Хаунсфилда — 30,09 HU)

предоперационного планирования у пациентов после остеосинтеза определение плотности опорных зон было затруднено из-за наличия «металлических артефактов» (рис. 1 и 2).

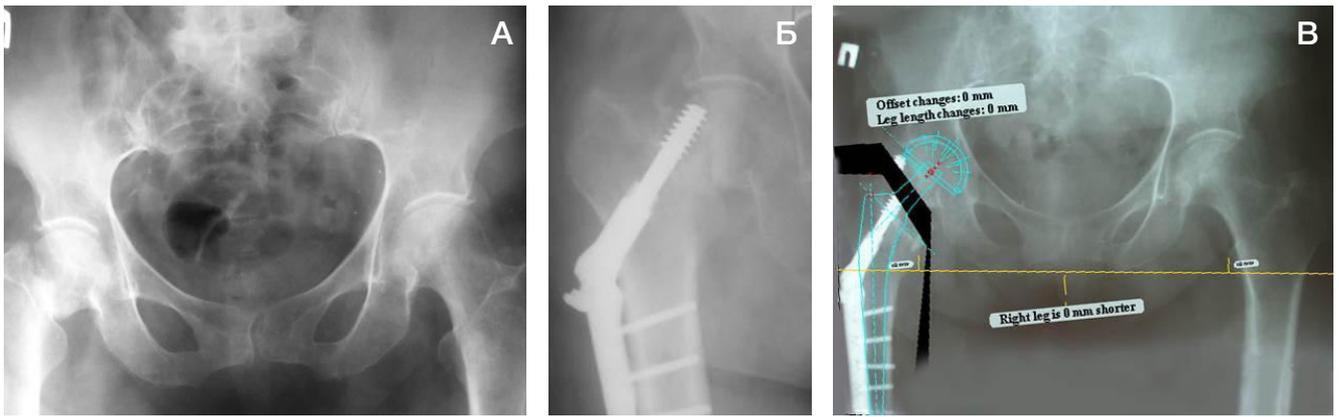
На втором этапе для определения оптимального размера и положения компонентов эндопротеза после создания объемной модели исходного состояния (рис. 4). Данный этап позволил провести оценку нарушения анатомии сегмента, определить более точное позиционирование эндопротеза, провести стартовую биомеханику, помимо этого, определить тактику проведения эндопротезирования ТБС. При выраженных деформациях ТБС помимо компьютерного моделирования проводили 3D-печать пораженного сегмента до и после эндопротезирования ТБС (рис. 5).

Третьим этапом при помощи программного обеспечения Geomagic Studio (Raindrop Geomagio Inc.; USA) и 3D Slicer (Copyright 2023, Slicer Community; USA) проводили виртуальную установку компонентов эндопротеза после создания объемной модели исходного состояния (рис. 4). Данный этап позволил провести оценку нарушения анатомии сегмента, определить более точное позиционирование эндопротеза, провести стартовую биомеханику, помимо этого, определить тактику проведения эндопротезирования ТБС. При выраженных деформациях ТБС помимо компьютерного моделирования проводили 3D-печать пораженного сегмента до и после эндопротезирования ТБС (рис. 5).

В контрольной группе ( $n = 108$ ) предоперационное планирование проводили с применением стандартных



**Рис. 2.** Определение плотности опорных зон кости в области вертлужной впадины на основе КТ пациента 73 лет в сагиттальной, горизонтальной и фронтальной проекциях. А. Оценка плотности в сагиттальной проекции. Б. Оценка плотности во фронтальной проекции. В. Оценка плотности в горизонтальной проекции. Общее среднее значение плотности костной ткани по шкале Хаунсфилда — 869,13 HU



**Рис. 3.** Обзорная рентгенограмма таза, правого ТБС в прямой проекции пациента 73 лет. Диагноз: состояние после остеосинтеза системой DHS. Ложный сустав шейки правой бедра. **А.** Рентгенограмма при поступлении на оперативное лечение- остеосинтез системой DHS правого бедра. **Б.** Рентгенограмма после остеосинтеза системой DHS. **В.** Определение размеров и позиционирование компонентов эндопротеза с помощью программы ТравмаКад, версии 2.4. (Планируемый размер вертлужного компонента — 50, бедренного компонента — 4.)

методов: использовали рентгенограммы таза с захватом ТБС в прямой-задней проекции и накладывали на нее шаблоны компонентов эндопротеза (скиц) для определения размера импланта.

После предоперационной подготовки в обеих исследуемых группах было проведено оперативное лечение — тотальное эндопротезирование ТБС.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

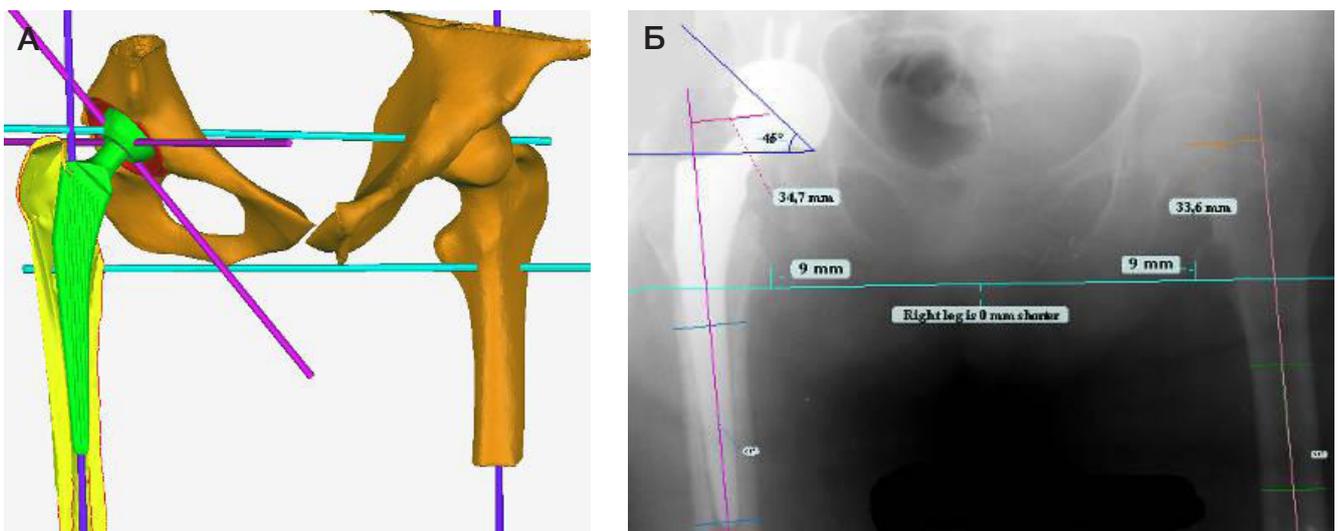
Оценку результатов проводили на основании соответствия размеров компонентов эндопротеза, которые определяли в предоперационном периоде и во время самой операции (интраоперационно). У пациентов с остеоартрозом и аваскулярным некрозом головки бедра в основной группе точность определения размеров импланта была выше, но сопоставима с контрольной группой ( $p > 0,05$ ), в подгруппе с посттравматической патологией была отмечена статистически значимая разница по точности определения предполагаемых размеров компонентов эндопротеза в основной и контрольной группах ( $p_{\kappa} = 0,002$ ). Основные результаты и точность определения размеров импланта в зависимости от нозологии и примененного метода

предоперационного планирования продемонстрированы в табл. 1 и на рис. 6.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сопоставимость результатов у пациентов с остеоартрозом и асептическим некрозом в основной и контрольных группах может быть связана с незначительными анатомическими нарушениями сегмента таза и нижней конечности, в то время как у пациентов с посттравматической патологией планируемые размеры компонентов эндопротеза в контрольной группе не соответствовали фактически установленной более чем в половине случаев, что говорит о низкой эффективности применения стандартного метода планирования для данной группы пациентов, ввиду более выраженной нарушенной анатомии сегментов в результате перелома, последствий остеосинтеза и реконструктивных операций, а также нарушения анатомии ТБС, конгруэнтности суставных поверхностей, вторичной деформации таза и позвоночника, укорочения нижней конечности более чем на 3 см [10–12].

В результате анализа был создан алгоритм выбора различных методов предоперационного планирования в



**Рис. 4.** Пациентка, 73 года. Сравнение размеров компонентов эндопротеза при предоперационном планировании на основе объемного моделирования и после проведения эндопротезирования ТБС. **А.** Объемная модель правого ТБС с виртуальной установкой компонентов эндопротеза (планируемый размер вертлужного компонента — 52, бедренного компонента — 6). **Б.** Обзорная рентгенограмма таза и правого ТБС после установки эндопротеза, установленные размеры вертлужного и бедренного компонентов соответствовали запланированным



**Рис. 5.** Пациент, 45 лет. Предоперационное планирование на основе объемного прототипирования. **А.** Напечатанная 3D-модель ТБС до эндопротезирования. **Б.** Напечатанная 3D-модель ТБС после проведения эндопротезирования. **В.** Предоперационное планирование артропластики правого ТБС на основе объемного моделирования

**Таблица 1.** Точность определения размеров компонентов эндопротеза в зависимости от нозологической формы дегенеративно-дистрофических заболеваний ТБС (%)

	Остеоартроз (подгруппа I)		Аvascularный некроз головки бедра (подгруппа II)		Посттравматическая патология (подгруппа III)	
	Контрольная группа	Основная группа	Контрольная группа	Основная группа	Контрольная группа	Основная группа
Число человек	$n = 33$	$n = 34$	$n = 29$	$n = 30$	$n = 46$	$n = 52$
Точность определения размеров компонентов эндопротеза (%)	81,82	85,29 ( $p_x = 0,7$ )	82,76	86,67 ( $p_x = 0,68$ )	47,83	78,85 ( $p_x = 0,002$ )

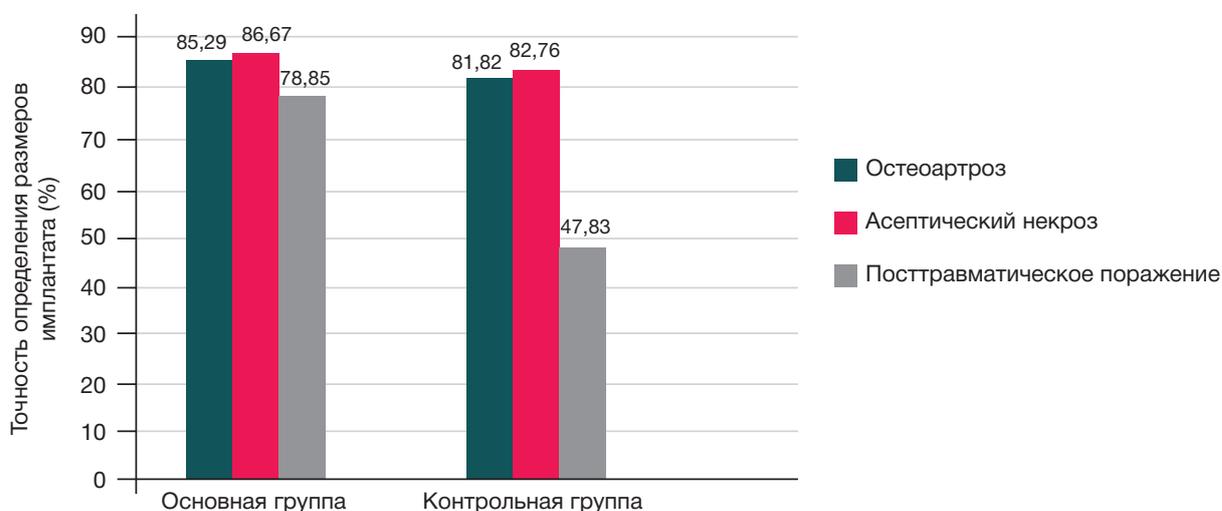
**Примечание:**  $p_x$  — статистическая значимость различий с контрольной группой.

зависимости от формы дегенеративно-дистрофических поражений ТБС и выраженности его анатомических нарушений (табл. 2).

## ВЫВОДЫ

Предложенный подход к выбору технологии предоперационного планирования позволяет точно определить размер компонентов эндопротеза, а также способствует правильной ориентации и позиционированию компонентов эндопротеза при проведении артропластики ТБС. Предложенный алгоритм трехэтапной методики показал более высокую эффективность предоперационного

планирования и индивидуального проектирования для пациентов с различной нозологической формой дегенеративно-дистрофических заболеваний ТБС по сравнению со стандартным методом и позволил точно определить размер компонентов эндопротеза. Предоперационное планирование эндопротезирования ТБС по предложенной методике позволяет оценить характеристики патологического процесса на локальном и системном уровнях. Наиболее сложная ситуация отмечена у пациентов с посттравматической патологией ТБС. Это связано с тем, что у данной группы пациентов, как правило, имеется значимое разрушение костных структур в опорных зонах бедра и вертлужной впадины.



**Рис. 6.** Точность определения размеров имплантата при различных способах предоперационного проектирования

Таблица 2. Выбор техники предоперационного планирования в зависимости от формы дегенеративно-дистрофических поражений ТБС

Группы пациентов	Этапы проведения предоперационного планирования
Пациенты с аваскулярным некрозом головки бедра, первичным остеоартрозом, без выраженных анатомических нарушений	<p>Определение на основе КТ по шкале Хаунсфилда плотности костной ткани вертлужной впадины в области опорных зон.</p> <p>Использование автоматизированной программы для определения размеров компонентов эндопротеза на основе 2D-проектирования</p>
Пациенты с аваскулярным некрозом головки бедра, первичным остеоартрозом с выраженной нарушенной анатомией (вторичной деформацией позвоночника, таза, анкилоз, ригидность, укорочение нижней конечности более чем на 3 см)	<p>Определение на основе КТ по шкале Хаунсфилда плотности костной ткани вертлужной впадины в области опорных зон.</p> <p>Использование автоматизированной программы для определения размеров компонентов эндопротеза на основе 2D-проектирования</p>
Пациенты с посттравматической патологией ТБС после проведения различных видов оперативного лечения (остеосинтеза) на проксимальном отделе бедра, а также после переломов вертлужной впадины	<p>Проведение предоперационного планирования с помощью создания 3D-объемных моделей</p>

## Литература

1. Khoziainova SS, et al. Physical therapy in the rehabilitation of patients after endoprosthetic replacement of major joints in the lower extremities: a scientometric analysis of evidence-based studies. *Vopr kurortol fizioter lech fiz kul't.* 2019; 96 (6): 22. DOI: 10.17116/kurort20199606122. Russian.
2. Thirion T, Georis P, Gillet P. Preoperative planning interest of a total hip prosthesis. *Rev Med Liege.* 2019; 74 (11): 593–597.
3. Huo Jet et al. Value of 3D preoperative planning for primary total hip arthroplasty based on artificial intelligence technology. *J Orthop Surg Res.* 2021; 16 (1): 156. DOI: 10.1186/s13018-021-02294-9.
4. Knafo Y, Houfani F, Zaharia B, Egrise F, Clerc-Urmès I, Mainard D. Value of 3D preoperative planning for primary total hip arthroplasty based on biplanar weightbearing radiographs. *BioMed Research International.* 2019; 2019: 1–7. DOI: 10.1155/2019/1932191.
5. Moraliidou M, Di Laura A, Henckel J, Hothi H, Hart AJ. Three-dimensional pre-operative planning of primary hip arthroplasty: a systematic literature review. *EFORT Open Reviews.* 2020; 5 (12): 845–855. DOI: 10.1302/2058-5241.5.200046.
6. Alagha MA, Logishetty K, O'Hanlon C, Liddle AD, Cobb J. Three-dimensional preoperative planning software for hip resurfacing arthroplasty. *Bioengineering (Basel).* 2023; 10 (8): 939. DOI: 10.3390/bioengineering10080939.
7. Schiffner E, et al. Is computerised 3D templating more accurate than 2D templating to predict size of components in primary total hip arthroplasty. *HIP International.* 2019; 29 (3): 270–275. DOI: 10.1177/1120700018776311.
8. Ding X, et al. Value of preoperative three-dimensional planning software (AI-HIP) in primary total hip arthroplasty: a retrospective study. *J Int Med Res.* 2021; 49 (11). DOI: 10.1177/03000605211058874.
9. Inoue D, et al. Value of computed tomography-based three-dimensional surgical preoperative planning software in total hip arthroplasty with developmental dysplasia of the hip. *Journal of Orthopaedic Science.* 2015; 20 (2): 340–46. DOI: 10.1007/s00776-014-0683-3.
10. Zheng Cao, Wei Yang, Minzhi Yang, Xiangpeng Kong, Yi Wang, Renwen Guo, et al. Application of preoperative digital-template planning in total hip arthroplasty via direct anterior approach. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2019; 33 (11): 1374–1378. DOI: 10.7507/1002-1892.201903108. In Chinese.
11. Takegami Y, Komatsu D, Seki T, Ishiguro N, Hasegawa Y. Total hip arthroplasty after failed curved intertrochanteric varus osteotomy for avascular necrosis of the femoral head. *Nagoya J Med Sci.* 2016; 78 (1): 89–97. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4767517/>.
12. Gautam D, Gupta S, Malhotra R. Total hip arthroplasty in acetabular fractures. *J Clin Orthop Trauma.* 2020; 11 (6): 1090–8. DOI: 10.1016/j.jcot.2020.10.037.

## References

1. Khoziainova SS, et al. Physical therapy in the rehabilitation of patients after endoprosthetic replacement of major joints in the lower extremities: a scientometric analysis of evidence-based studies. *Vopr kurortol fizioter lech fiz kul't.* 2019; 96 (6): 22. DOI: 10.17116/kurort20199606122. Russian.
2. Thirion T, Georis P, Gillet P. Preoperative planning interest of a total hip prosthesis. *Rev Med Liege.* 2019; 74 (11): 593–597.
3. Huo Jet et al. Value of 3D preoperative planning for primary total hip arthroplasty based on artificial intelligence technology. *J Orthop Surg Res.* 2021; 16 (1): 156. DOI: 10.1186/s13018-021-02294-9.
4. Knafo Y, Houfani F, Zaharia B, Egrise F, Clerc-Urmès I, Mainard D. Value of 3D preoperative planning for primary total hip arthroplasty based on biplanar weightbearing radiographs. *BioMed Research International.* 2019; 2019: 1–7. DOI: 10.1155/2019/1932191.
5. Moraliidou M, Di Laura A, Henckel J, Hothi H, Hart AJ. Three-dimensional pre-operative planning of primary hip arthroplasty: a systematic literature review. *EFORT Open Reviews.* 2020; 5 (12): 845–855. DOI: 10.1302/2058-5241.5.200046.
6. Alagha MA, Logishetty K, O'Hanlon C, Liddle AD, Cobb J. Three-dimensional preoperative planning software for hip resurfacing arthroplasty. *Bioengineering (Basel).* 2023; 10 (8): 939. DOI: 10.3390/bioengineering10080939.
7. Schiffner E, et al. Is computerised 3D templating more accurate than 2D templating to predict size of components in primary total hip arthroplasty. *HIP International.* 2019; 29 (3): 270–275. DOI: 10.1177/1120700018776311.
8. Ding X, et al. Value of preoperative three-dimensional planning software (AI-HIP) in primary total hip arthroplasty: a retrospective study. *J Int Med Res.* 2021; 49 (11). DOI: 10.1177/03000605211058874.
9. Inoue D, et al. Value of computed tomography-based three-dimensional surgical preoperative planning software in total hip arthroplasty with developmental dysplasia of the hip. *Journal of Orthopaedic Science.* 2015; 20 (2): 340–46. DOI: 10.1007/s00776-014-0683-3.
10. Zheng Cao, Wei Yang, Minzhi Yang, Xiangpeng Kong, Yi Wang, Renwen Guo, et al. Application of preoperative digital-template planning in total hip arthroplasty via direct anterior approach. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2019; 33 (11): 1374–1378. DOI: 10.7507/1002-1892.201903108. In Chinese.
11. Takegami Y, Komatsu D, Seki T, Ishiguro N, Hasegawa Y. Total hip arthroplasty after failed curved intertrochanteric varus osteotomy for avascular necrosis of the femoral head. *Nagoya J Med Sci.* 2016; 78 (1): 89–97. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4767517/>.
12. Gautam D, Gupta S, Malhotra R. Total hip arthroplasty in acetabular fractures. *J Clin Orthop Trauma.* 2020; 11 (6): 1090–8. DOI: 10.1016/j.jcot.2020.10.037.

## ТЕХНОЛОГИЯ МИКРОХИРУРГИЧЕСКОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ ФОВЕА ПРИ МАКУЛЯРНЫХ РАЗРЫВАХ

Х. П. Тахчиди ✉

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

Одной из ведущих витреоретинальных патологий, приводящих к значительному ухудшению зрительных функций, является макулярный разрыв. В последние годы в хирургии макулярных разрывов перспективно использование аутоплазмы крови с повышенным содержанием тромбоцитов. Но, несмотря на высокий процент закрытия макулярных разрывов (78–96%), на сегодняшний день актуальным вопросом остается разработка новых технологий, направленных на восстановление микроархитектоники фовеолярной области и повышения зрительных функций. Целью исследования было разработать новую технологию реконструкции фовеолярной области при макулярных разрывах с использованием аутологичной кондиционированной плазмы. В представленную работу вошли 9 пациентов (10 глаз) с идиопатическим сквозным макулярным разрывом, которым была выполнена стандартная трехпортовая 27G-вitrektomia с применением аутологичной кондиционированной плазмы по разработанной технологии. В результате хирургического лечения предлагаемая технология позволяет получить высокие клинико-функциональные результаты, а также обеспечивает оптимальную и более управляемую реконструкцию микроархитектонику фовеа.

**Ключевые слова:** макулярный разрыв, оптическая когерентная томография, аутологичная кондиционированная плазма, витректomia, компьютерная микропериметрия

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 224 от 19 декабря 2022 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на хирургическое лечение и обработку персональных данных.

✉ **Для корреспонденции:** Христо Периклович Тахчиди  
Волоколамское шоссе, д. 30, корп. 2, г. Москва, 123182, Россия; hpt1301@gmail.com

**Статья получена:** 04.12.2023 **Статья принята к печати:** 18.12.2023 **Опубликована онлайн:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.055

## FOVEAL MICROSURGICAL RECONSTRUCTION TECHNIQUE FOR MACULAR HOLE

Takhchidi KP ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Macular rupture is among major vitreoretinal disorders resulting in significant visual function decline. In recent years, the use of platelet-rich autoplasm in the macular rupture surgery is considered to be promising. However, despite high rate of macular rupture closure (78–96%), the development of new technology for foveal microarchitectonics restoration and visual function improvement currently remains a pressing issue. The study was aimed to develop a new foveal reconstruction technique for macular rupture involving the use of autologous conditioned plasma. The reported study involved 9 patients (10 eyes) with idiopathic macular hole, who underwent standard three-port 27G vitrectomy involving the use of autologous conditioned plasma in accordance with the technique developed. The proposed technique makes it possible to achieve good clinical and functional surgical treatment outcome and ensures optimal and more manageable reconstruction of foveal microarchitectonics.

**Keywords:** macular rupture, optical coherence tomography, autologous conditioned plasma, vitrectomy, microperimetry

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 224 dated 19 December 2022). All patients submitted the informed consent to surgical treatment and personal data processing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Khristo P. Takhchidi  
Volokolamskoe shosse, 30, corp. 2, Moscow, 123182, Russia; hpt1301@gmail.com

**Received:** 04.12.2023 **Accepted:** 18.12.2023 **Published online:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.055

Идиопатический макулярный разрыв представляет собой фовеальный дефект, затрагивающий все нейроретинальные слои и характеризующийся снижением остроты зрения, возникновением центральной скотомы и метаморфозий [1–4]. По данным литературы, частота развития макулярного разрыва составляет примерно 3–5 случаев на 1000 человек старше 55 лет, чаще возникает у женщин в возрасте 60–70 лет. В 80% случаев заболевание одностороннее [5].

Для оценки состояния центральной зоны сетчатки при макулярных разрывах в 2013 г. исследователями International Vitreomacular Traction Study Group (IVTSG) была предложена анатомическая классификация, основанная на данных оптической когерентной томографии. Согласно классификации, макулярные разрывы характеризуются по минимальному диаметру на малый ( $\leq 250$  мкм), средний (250–400 мкм), большой ( $>400$  мкм) [6, 7].

Долгое время золотым стандартом лечения сквозного макулярного разрыва считали витректomia, проведение пиллинга внутренней пограничной мембраны (ВПМ) с

последующей тампонадой воздухом/газо-воздушной смесью [8]. С целью дополнительного повышения эффективности предложены модификации хирургического подхода в лечении макулярных разрывов: механическое сближение краев разрыва, проведение пиллинга ВПМ с последующим закрытием разрыва инвертированным лоскутом ВПМ, амниотической мембраной, трансплантация передней капсулы хрусталика, сохранение ВПМ [9–12].

В последние годы одним из перспективных направлений в хирургии макулярных разрывов является использование аутоплазмы крови с повышенным содержанием тромбоцитов. В настоящее время в лечении патологии сетчатки активно применяют две методики получения плазмы: PRP (от англ. platelet-rich plasma) — богатую тромбоцитами плазму крови (в 3–4 раза больше от первоначального содержания крови) и аутологичную кондиционированную плазму АКП, или АСП (от англ. autologous conditioned plasma), практически лишенную лейкоцитов и содержащую повышенную концентрацию тромбоцитов (в 2–3 раза больше от первоначального содержания

крови). Локальное использование аутологических факторов в хирургии макулярной патологии позволяет получить хороший анатомический результат и минимизировать объем хирургических манипуляций в центральной зоне сетчатки [6, 13–15]. Но несмотря на высокий процент закрытия макулярных разрывов (78–96%) [16, 17], на сегодняшний день актуальным вопросом остается борьба за восстановление микроархитектоники фовеолярной области и, как следствие, повышение зрительных функций.

Целью исследования было разработать новую технологию реконструкции фовеолярной области при макулярных разрывах с использованием аутологичной кондиционированной плазмы.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование вошли 9 пациентов (10 глаз) в возрасте 62–76 лет (средний возраст  $66,1 \pm 7,41$  лет), прооперированных в Научно-исследовательском центре офтальмологии РНИМУ им. Н. И. Пирогова по поводу идиопатического сквозного макулярного разрыва.

Всем пациентам было проведено комплексное офтальмологическое обследование стандартными методами: визометрия с определением некорригированной остроты зрения (НКОЗ) и максимально корригированной остроты зрения (МКОЗ), пневмотонометрия, биомикроофтальмоскопия с помощью бесконтактной линзы MaxField (Ocular Inc.; США), а также специальными методами, такими как спектральная оптическая когерентная томография (СОКТ) на приборе «Spectralis HRA+OCT» («Spectralis HRA+OCT», Heidelberg Engineering, Module, OCT-2 85 000 Hz, Inc.; Германия), компьютерная микропериметрия (MAIA, CenterVue; Италия).

Критерии включения в исследование: наличие идиопатического сквозного макулярного разрыва. Критерии исключения: наличие сопутствующей офтальмопатологии (возрастная макулодистрофия, глаукома, частичная атрофия зрительного нерва, сосудистые нарушения, диабетическая ретинопатия, внутриглазное образование, отслойка сетчатки, наличие рубцов и помутнений роговицы), травматический макулярный разрыв, длительность макулярного разрыва более 6 месяцев.

Длительность макулярного разрыва до проведения оперативного лечения составляла от 3 недель до 5 месяцев. Срок наблюдения пациентов — от 3 до 16 месяцев.

Обработку результатов исследования проводили с помощью стандартных инструментов описательной статистики Microsoft Office Excel. Данные представлены в виде  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $\sigma$  — стандартное отклонение.

При обследовании НКОЗ составила  $0,18 \pm 0,13$ , МКОЗ —  $0,3 \pm 0,17$ . При проведении ОКТ во всех случаях визуализировались сквозные макулярные разрывы с интратретинальными кистами. Средний максимальный диаметр макулярного разрыва составил  $759,2 \pm 174,7$  мкм, средний минимальный диаметр —  $343,4 \pm 96,6$  мкм, показатель средней центральной толщины сетчатки (ЦТС) —  $416 \pm 65,3$  мкм. По классификации IVTSG пациенты разделились следующим образом: в группе  $\leq 250$  мкм — 0 глаз; в группе 251–400 мкм — 7 глаз; в группе  $\geq 401$  мкм — 3 глаза. При выполнении компьютерной микропериметрии средняя величина светочувствительности (СЧ) сетчатки в исследуемой группе составила  $22,7 \pm 1,52$  дБ.

Всем пациентам было проведено лечение по разработанной технологии: первым этапом пациентам

с помутнением хрусталика была выполнена факоэмульсификация катаракты с имплантацией интраокулярной линзы. Далее выполняли трехпортовую 27G-вitreктомия, выделение и удаление задней гиалоидной мембраны. Затем проводили окрашивание и удаление ВПМ. После удаления ВПМ не менее 1/3 объема витреальной полости замещали перфторорганическим соединением (ПФОС), который занимает задний полюс глаза и герметично «накрывает» макулярный разрыв. В результате, во внутрираневои зоне макулярного разрыва остается герметично закрытая внутриглазная жидкость, находящаяся под давлением ирригационной жидкости и высоты столба ПФОС. Затем производили эвакуацию жидкости из зоны макулярного разрыва экструзионной иглой в пассивном режиме при давлении ирригационной жидкости 15 мм рт. ст. Срез иглы подводили вертикально вплотную к зоне разрыва, не соприкасаясь с сетчаткой. Вследствие разницы вязкости ПФОС и внутриглазной жидкости, более подвижной при конкурентной аспирации оказывается внутриглазная жидкость, которую приоритетно эвакуировали из зоны разрыва (рис. 1). По мере эвакуации внутрираневои жидкости в зоне разрыва возникает отрицательное давление («мягкий микровакuum»), которое равномерно, атравматично стягивает и соединяет «рваные» стенки макулярного разрыва по всему раневому периметру. Для визуального контроля процесса соединения стенок разрыва кончик иглы приподнимали над зоной разрыва. При отсутствии полного соединения стенок разрыва, манипуляцию аспирации внутрираневои жидкости можно повторять многократно до достижения необходимого результата соединения. В случае незапланированной аспирации («прилипания») внутренней поверхности сетчатки краев макулярного разрыва необходимо прекратить пассивную аспирацию, закрыв пальцем отверстие экструзионной иглы и медленно перпендикулярно поверхности поднять срез иглы над сетчаткой. В результате этого действия поверхность сетчатки, находящаяся под равномерным давлением силы тяжести ПФОС, одномоментно мягко «отлипает» от наконечника иглы, не травмируя ткань сетчатки. Проведение этой процедуры не сопряжено ни с какими рисками.

Под действием отрицательного давления в зоне разрыва соединенная фовеолярная ткань сомкнутых стенок макулярного разрыва удерживается в этом положении силой тяжести ПФОС, в течение не менее 10 мин (время удержания разрыва) (рис. 2). За этот промежуток времени интраоперационно готовили АКП при помощи двойного шприца Arthrex ACP. Проводили забор 15 мл венозной крови пациента в шприц Arthrex ACP. После забора крови шприц устанавливали в центрифугу ROTOFIX 32A (Hettich; Германия) с последующим центрифугированием в течение 5 мин со скоростью 1700 об./мин. Набирали 0,2–0,4 мл АКП в микрошприц для нанесения аппликаций на зону макулярного разрыва. После прохождения необходимого времени удержания макулярного разрыва в сомкнутом состоянии (не менее 10 мин) производили обмен ПФОС на ирригационную жидкость. В этот момент, за счет ослабления центробежных сил эластичности растянутой ткани сетчатки, соединенные стенки макулярного разрыва временно удерживаются в сомкнутом состоянии. Этого промежутка времени достаточно для нанесения аппликации приготовленной аутоплазмы, из которой на поверхности сетчатки макулярной области образуется герметичная бляшка, накрывающая зону разрыва. Слои аутоплазмы наносили на макулярную область до

появления тусклой, полупрозрачной бляшки (рис. 3А). После чего ирригационную жидкость замещали на воздух.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В срок наблюдения один месяц после оперативного лечения (девять пациентов, 10 глаз) показатели НКОЗ увеличились до  $0,45 \pm 0,21$ , МКОЗ составила  $0,54 \pm 0,13$ . По данным компьютерной микропериметрии средняя СЧ сетчатки составила  $24,86 \pm 1,53$  дБ. По данным ОКТ, показатель средней ЦТС уменьшился с  $416 \pm 65,3$  мкм до  $299,3 \pm 49,2$  мкм.

На контрольном осмотре через три месяца НКОЗ увеличилась до  $0,53 \pm 0,22$ , МКОЗ — до  $0,66 \pm 0,12$ . Средняя СЧ составила  $25,27 \pm 3,3$  дБ. Показатель средней ЦТС уменьшился до  $290,3 \pm 46,3$  мкм.

В срок наблюдения шесть месяцев (семь пациентов, восемь глаз) НКОЗ —  $0,53 \pm 0,3$ , МКОЗ —  $0,73 \pm 0,15$ . Показатель средней ЦТС составил  $274,6 \pm 37,6$  мкм. Средняя СЧ сетчатки —  $25,7 \pm 2,11$  дБ.

Через год (пять пациентов, шесть глаз) показатели НКОЗ —  $0,42 \pm 0,33$ , МКОЗ —  $0,75 \pm 0,21$ . По данным ОКТ средняя ЦТС составила  $285,2 \pm 31,8$  мкм. Средняя СЧ сетчатки  $25,4 \pm 2,32$  дБ.

С максимальным сроком наблюдения до 16 месяцев находится один пациент (один глаз) с дооперационными показателями НКОЗ —  $0,05$ , МКОЗ —  $0,1$ . Показатель ЦТС составил  $450$  мкм. Средняя СЧ сетчатки —  $22,7$  дБ. На контрольном осмотре после хирургического лечения через 16 месяцев НКОЗ и МКОЗ увеличились до  $0,1$  и  $0,8$  соответственно. Показатель ЦТС уменьшился до  $336$  мкм. Средняя СЧ сетчатки составила  $27,8$  дБ.

В результате хирургического лечения по данным ОКТ визуализируются полное закрытие макулярного разрыва и анатомическое восстановление фовеа во всех случаях. В раннем послеоперационном периоде (через 6 ч и 3 суток) по данным ОКТ отмечается регресс интравитреальных кист, которые были диагностированы перед хирургическим вмешательством (рис. 4, 5).

Послеоперационных осложнений ни в одном случае не отмечено, в течение всего периода наблюдения с момента операции рецидивы отсутствовали.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В процессе формирования макулярного разрыва часть ткани фовеа погибает. Микроморфологической основой восстановления зрительных функций являются остатки высокофункциональной фовеолярной ткани сетчатки. Однако после макулярного разрыва сохранившаяся часть фовеолярной ткани смещается со своих микроанатомических/микрогистологических мест. Вследствие этого нарушается микроархитектоника оставшейся части ткани фовеа и, соответственно, происходит снижение зрительных функций. Ситуацию дезорганизации макулярной ткани усугубляют отек и микрокистоз — последствия посттравматического воспаления и дегенерации. Кроме того, наличие круглого дефекта ткани в фовеа создает приоритет для центробежных сил, связанных с эластичностью сохранившейся ткани сетчатки, которые со временем активнее растягивают и смещают остатки ткани фовеа к периферии макулярной области.

Для репозиции краев макулярного разрыва рядом авторов описаны методики их механического

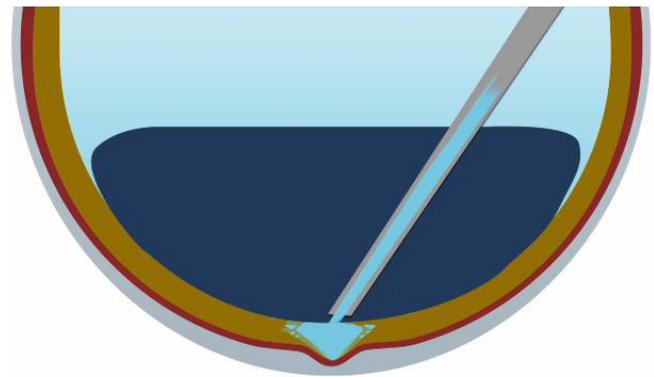


Рис. 1. Этапы технологии: замещение витреальной полости перфторорганическим соединением с последующей пассивной аспирацией внутриглазной жидкости из зоны разрыва

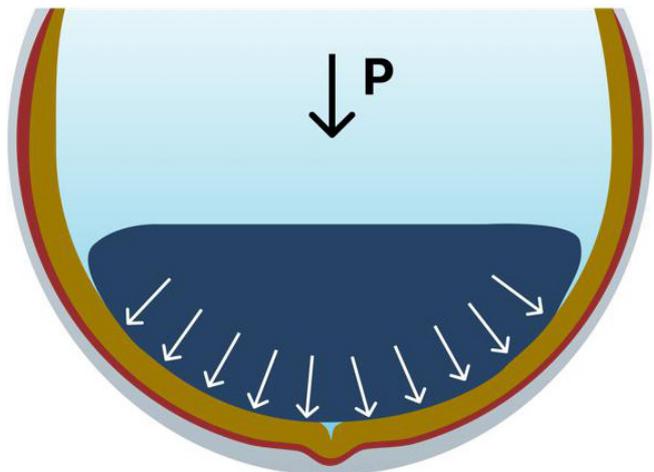


Рис. 2. Этапы технологии: под действием отрицательного давления в зоне разрыва соединенная фовеолярная ткань сомкнутых стенок макулярного разрыва удерживается в этом положении силой тяжести интравитреального соединения

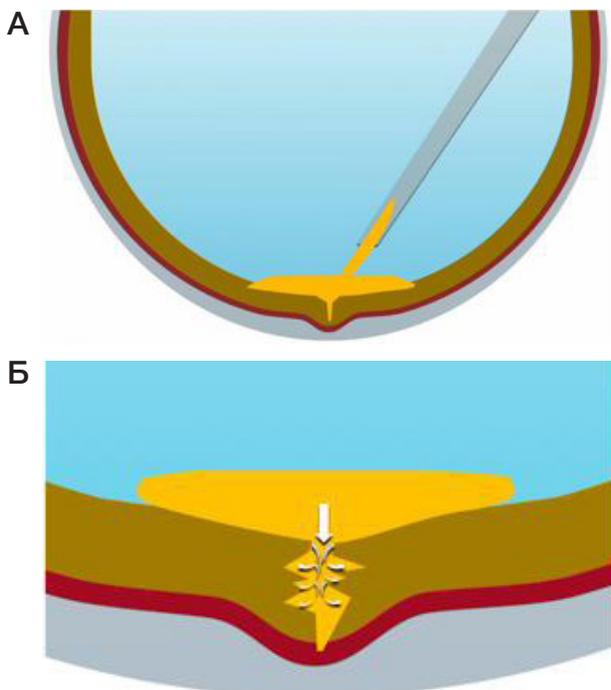
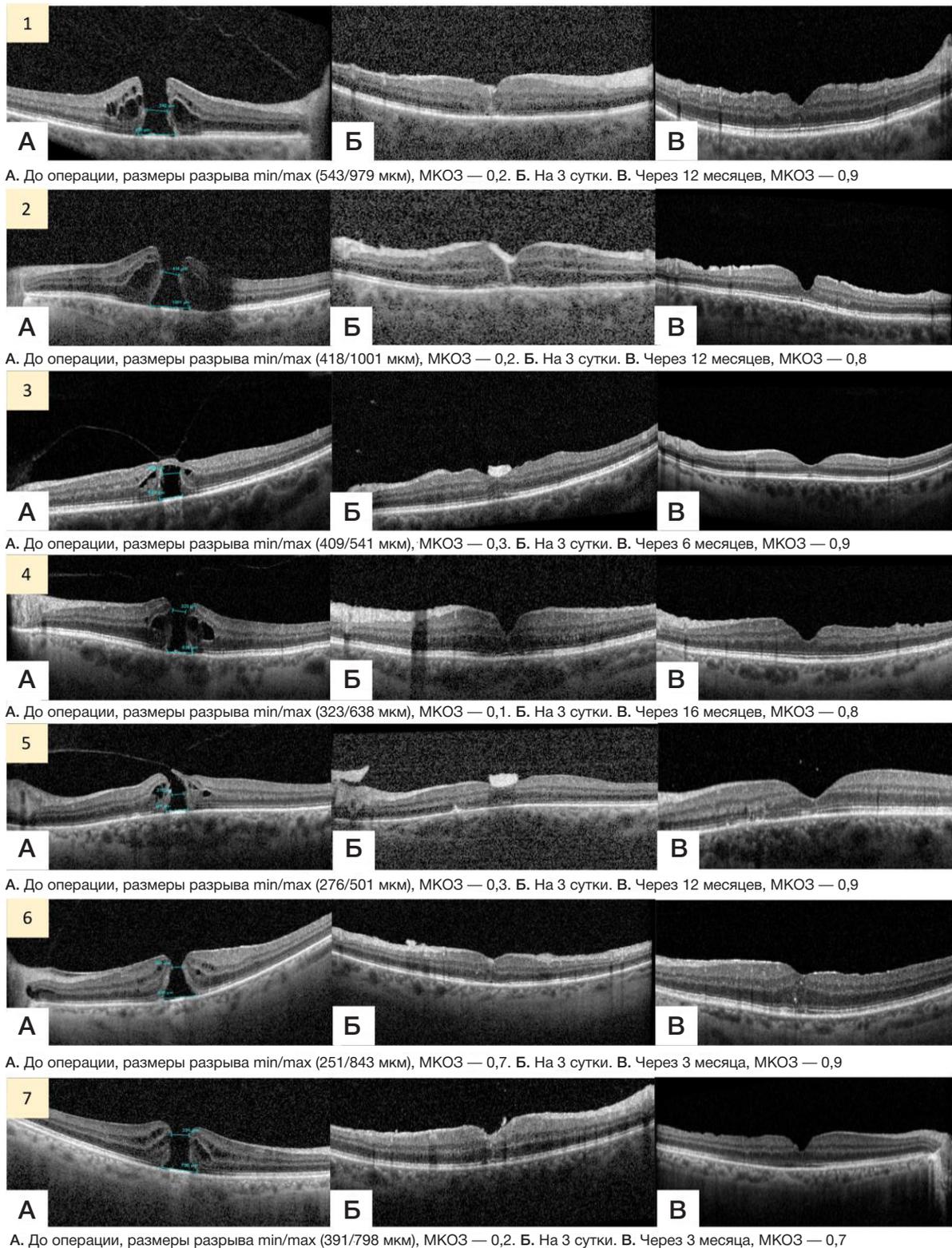


Рис. 3. Этапы технологии: нанесение аппликаций приготовленной АКП на поверхность сетчатки макулярной области с последующим образованием герметичной бляшки, накрывающей зону разрыва (А) и полностью заполняющей интравитреальное пространство (Б)

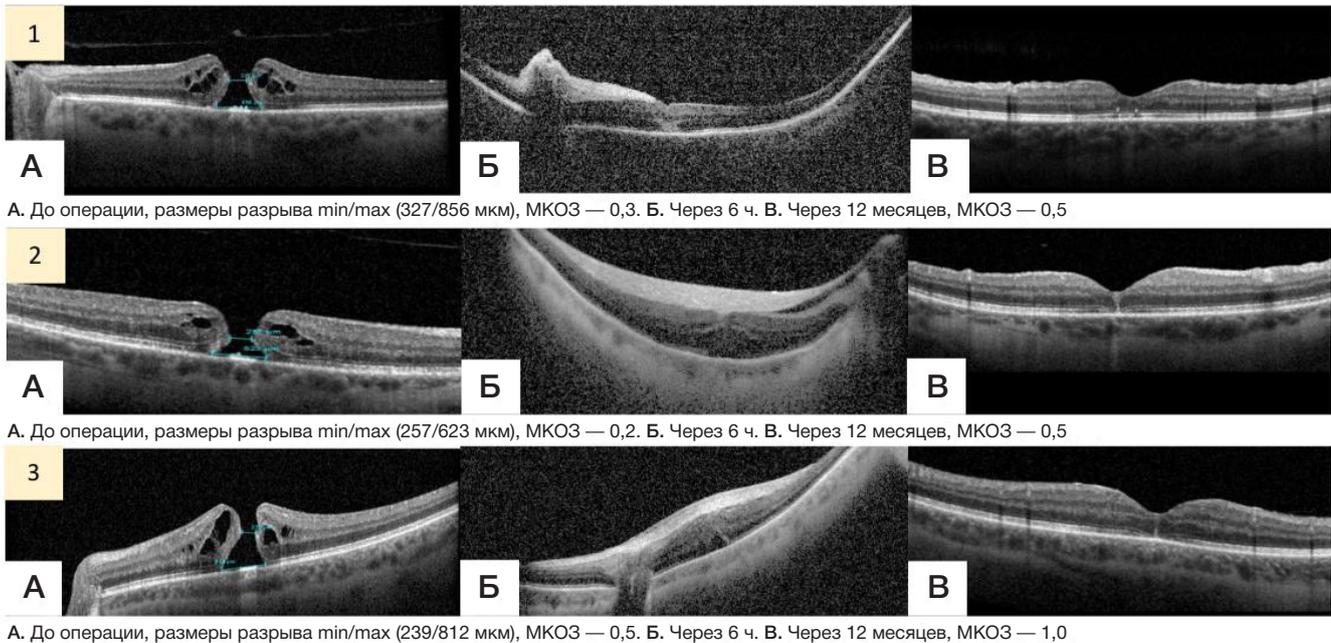


**Рис. 4.** ОКТ сетчатки. Этапы смыкания макулярного разрыва после витрэктомии с применением АКП. А. Определяется дефект всех нейроретинальных слоев (макулярный разрыв). Б. В ранние сроки послеоперационного наблюдения (на третьи сутки). В. В отдаленные сроки наблюдения

сближения путем разглаживания сетчатки вокруг разрыва витреальным шпателем по направлению от периферии к центру [18] или использования «массажа» сетчатки силиконовой канюлей [19]. Однако при проведении данных манипуляций существенно повышается риск травматизации ретинальных структур с развитием реактивного макулярного отека, дислокацией и повреждением ретинального пигментного эпителия и

спонтанного микроотрыва сетчатки по краю разрыва, что, в свою очередь, может приводить к потере фовеолярной ткани и снижению функционального потенциала сетчатки после анатомического соединения [20–22].

Предлагаемая технология удаления жидкости при помощи пассивной аспирации из зоны макулярного разрыва под герметичным прикрытием этой зоны ПФОС обеспечивает управляемую максимальную



**Рис. 5.** ОКТ сетчатки. Этапы смыкания макулярного разрыва после витрэктомии с применением АКП. **А.** Определяется дефект всех нейроретинальных слоев (макулярный разрыв). **Б.** В ранние сроки послеоперационного наблюдения (через 6 ч). **В.** В отдаленные сроки наблюдения

нетравматичную эвакуацию жидкости из разрыва и окружающих тканей сетчатки макулярной области. Удаляемая таким образом жидкость создает постепенно нарастающее отрицательное давление — микровакуум во внутриранеовом пространстве макулярного разрыва, генерирующий центростремительные силы, которые в первую очередь подтягивают и соединяют наиболее ценные в функциональном отношении пристеночные краевые остатки фовеолярной ткани. В то же время соединенные стенки макулярного разрыва силой тяжести ПФОС фиксируются в зоне фовеа.

Таким образом, в результате постепенно нарастающего «микровакуума», по всему периметру окружности макулярного разрыва, происходит одновременное малотравматичное стягивание, разглаживание и соединение противоположных стенок макулярного разрыва за разорванные участки сохранившейся фовеолярной ткани. Параллельно с этим процессом в результате действия силы тяжести ПФОС соединенные остатки ткани стенок макулярного разрыва фиксируются и удерживаются в зоне фовеа. Эта микроманипуляция возвращает сохранившуюся фовеолярную ткань к исходному микроанатомическому/микрогистологическому положению.

Предлагаемое технологией время удержания стенок разрыва силой тяжести ПФОС в сомкнутом состоянии (не менее 10 мин) дает возможность в растянутой ткани сетчатки значительно ослабить центробежные силы эластичности. Эта важная особенность позволяет после удаления ПФОС временно удерживать в сомкнутом состоянии соединенные стенки макулярного разрыва. Таким образом появляется достаточный промежуток времени для покрытия раневой поверхности АКП с формированием герметичной бляшки. По мере наложения АКП на зону раневого соединения, параллельно с процессом завершения формирования бляшки во внутриранеовом пространстве макулярного разрыва происходят следующие события.

Под формирующейся бляшкой АКП после прекращения действия удерживающей силы (фиксирующей силы, тяжести ПФОС) активируются сохранившиеся

центробежные силы эластичности ткани сетчатки, которые начинают растягивать сомкнутые стенки макулярного разрыва в центробежном направлении. В результате под герметичной бляшкой происходит частичное микрорасхождение стенок макулярной раны. В момент микрорасхождения стенок макулярной раны в образующемся раневом микропросвете возникает отрицательное давление, которое нарастает по мере увеличения микропросвета и формирует микровакуумный эффект, обеспечивающий всасывание жидких фракций еще полностью несвернувшейся АКП. Этот процесс по времени динамичный и идет на уровне микроскопических изменений.

Всасывающаяся в микропросвет АКП (рис. 3Б) осуществляет наиболее полное микроскопическое покрытие склеиваемых неровных поверхностей стенок разорванной макулярной ткани. При этом происходит затекание аутоплазмы в неровности, микротрещины и микрополости. Таким образом, достигается максимальное покрытие АКП («биологическим клеем») соединяемых (склеиваемых) раневых поверхностей макулярного разрыва.

Между соединяемыми поверхностями образуется склеивающий биологический вкладыш (сгусток) из свернувшейся АКП. На томограммах (рис. 5), где удалось сделать снимки ОСТ на воздушной тампонаде через 6 ч после операции, хорошо видно, как АКП полностью заполняет внутриранеовое пространство, затекая в неровности стенок раны. Вкладыш из АКП имеет разветвленную конфигурацию, повторяет неровный рельеф стенок макулярного разрыва. Это подтверждает механизм микровакуумного всасывания АКП из покрывающей макулярный разрыв бляшки. Кроме того, уже на этом этапе обращает на себя внимание отсутствие ретинальных пристеночных кист и полостей, что демонстрирует хорошую эвакуацию из макулярного разрыва не только внутриранеовой, но и внутритканевой жидкости из пристеночных зон макулярного разрыва, включая ретинальные кисты и полости стенок разрыва.

На третьи сутки все эти признаки усиливаются, что подтверждает вышеописанные механизмы реконструкции

фовеа (рис. 4). В большинстве случаев вкладыш превращается в линию соединения (склеивания) разрыва макулы с формированием макулярного профиля и морфологической организацией тканевой структуры макулярной/фовеолярной области. Происходит процесс восстановления архитектоники макулярной/фовеолярной области. На снимках просматриваются процессы сегментации сетчатки и восстановления наиболее значимых структур сетчатки: фовеолярный профиль, эллипсоидная зона, наружная пограничная мембрана, наружный плексиформный слой, внутренний плексиформный слой.

В отдаленном периоде восстановление архитектоники завершается, формируется нежный рубец в фовеа на месте разрыва, вокруг которого соединяются каркасные структуры сетчатки макулярной/фовеолярной зоны. Сохранившиеся нейронные клеточные структуры фовеа стремятся занять свои нормальные микроанатомические/микроструктурные места, обеспечивая восстановление сохранившегося зрительного потенциала сетчатки. Таким образом, завершается процесс микрореконструкции архитектоники фовеа.

Помимо склеивающего потенциала, вкладыш имеет не менее значимый набор естественных биологических веществ, обеспечивающих регенерационный и репаративный потенциал. По сути, предлагаемая технология максимально приближается к микромеханизмам

естественного восстановительного процесса ткани, который обеспечивает постоянное физиологическое самовосстановление микроповреждений ткани, происходящих в процессе активной жизнедеятельности организма человека.

## ВЫВОДЫ

1. Использование мягкого микровакуума в атравматичном соединении остатков фовеолярной ткани сетчатки, а также в максимальном покрытии склеивающим веществом неровных поверхностей разорванной ткани макулы обеспечивает оптимальную реконструкцию микроархитектоники фовеа.
2. В результате понимания микропроцессов, происходящих при предлагаемой технологии соединения (склеивания) стенок макулярного разрыва, появляется возможность совершенствовать технологию и добиваться более высокого и полноценного восстановления зрительных функций.
3. Приближение технологий к естественным процессам самовосстановления живой ткани позволяет оптимально использовать ресурс организма в восстановлении поврежденных микроструктур фовеа и жизненно важных функций.
4. Более тонкое понимание микропроцессов при манипуляциях в микромире живой ткани открывает новые возможности в развитии клинической медицины микромира живого человека.

## Литература

1. Аксенова С. В., Хозина Е. А., Васильева О. А., Кумакшева Т. Н., Зотов Р. А. Макулярный разрыв: современные аспекты этиологии, диагностики и лечения. *Современные проблемы науки и образования*. 2023; 2.
2. Sen S, Udaya P, Maheshwari JJ, Ramasamy K, Kannan NB, Dharmalingam K. Profiling of idiopathic macular hole vitreous proteome identifies the role of extracellular matrix remodelling, epithelial-mesenchymal transformation and unfolded protein-response pathways. *Indian J Ophthalmol*. 2023; 71 (5): 2027–40.
3. Nicolosi C, Vicini G, Bacherini D, Giattini D, Lombardi N, Esposito C, Rizzo S, Giansanti F. Non-Invasive Retinal Imaging Modalities for the Identification of Prognostic Factors in Vitreoretinal Surgery for Full-Thickness Macular Holes. *Diagnostics*. 2023; 13 (4): 589.
4. Shukla D, Kalliath J, Srinivasan K, Neelakantan N, Rajendran A, Naresh KB, et al. Management of rhegmatogenous retinal detachment with coexisting macular hole: a comparison of vitrectomy with and without internal limiting membrane peeling. *Retina*. 2013; 33 (3): 571–78.
5. Duker JS, Kaiser PK, Binder S, et al. The International Vitreomacular Traction Study Group classification of vitreomacular adhesion, traction, and macular hole. *Ophthalmology*. 2013; 120 (12): 2611–19.
6. Бронский Д. И., Зайка В. А., Якимов А. П. Оценка изменения эллипсоидной зоны сетчатки до и после хирургического лечения сквозных макулярных разрывов. *Офтальмохирургия*. 2023; 3: 72–77.
7. Lachance A, You E, Garneau J, Bourgault S, Caissie M, Tourville E, Dirani A. Revision surgery for idiopathic macular hole after failed primary vitrectomy. *J Ophthalmol*. 2021; p. 1–7.
8. Шкворченко Д. О., Крупина Е. А., Фомин А. В. ОКТ-ангиография в оценке результатов хирургического лечения макулярных разрывов. *Офтальмология*. 2019; 16 (3): 310–6.
9. Бронский Д. И., Жукова С. И., Зайка В. А., Шуко А. Г. Оценка степени восстановления структуры сетчатки и хориоретинального кровотока после хирургического лечения макулярных разрывов большого диаметра. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6 (6–1): 159–67.
10. Stappeler T, Montesel A, Konstantinidis L, Wolfensberger TJ, Eandi CM. Inverted internal limiting membrane flap technique for macular hole coexistent with rhegmatogenous retinal detachment. *Retina*. 2022; 42 (8): 1491–7.
11. Zhao PP, Wang S, Liu N, Shu ZM, Zhao JS. A review of surgical outcomes and advances for macular holes. *J Ophthalmol*. 2018; p.1–10
12. Abouhoussein MA, Elbaha SM, Aboushousha M. Human amniotic membrane plug for macular holes coexisting with rhegmatogenous retinal detachment. *Clin Ophthalmol*. 2020; (14): 2411–6.
13. Крупина Е. А. Хирургическое лечение идиопатического макулярного разрыва с применением богатой тромбоцитами плазмы крови [диссертация]. М., 2019.
14. Попов Е. М., Куликов А. Н., Чурашов С. В., Гаврилюк И. О., Егорова Е. Н., Аббасова А. И. Сравнение показателей получаемой разными способами аутоплазмы, используемой для лечения пациентов с макулярным разрывом. *Офтальмологические ведомости*. 2021; 14 (4): 27–34.
15. Арсюттов Д. Г. Использование аутологичной кондиционированной плазмы, обогащенной тромбоцитами, в хирургии регматогенной отслойки сетчатки с центральным и периферическими разрывами. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4 (4): 61–65.
16. Байбородов Я. В., Жоголев К. С. Аутологичная кондиционированная плазма — индуцированная фибриновая пленка в хирургическом лечении макулярных разрывов. *Современные технологии в офтальмологии*. 2020; (4): 283.
17. Meuer SM, Myers CE, Klein BE, Swift MK, Huang Y, Gangaputra S, Pak JW, Danis RP, Klein R. The epidemiology of vitreoretinal interface abnormalities as detected by spectral-domain optical coherence tomography: the beaver dam eye study. *Ophthalmology*. 2015; 122 (4): 787–95.
18. Бикбов М. М., Алтынбаев У. Р. Способ хирургического лечения макулярного разрыва. Патент РФ №2407493. 27.12.2010
19. Бикбов М. М., Алтынбаев У. Р., Гильманшин Т. Р., Чернов М. С. Выбор способа интраоперационного закрытия идиопатического макулярного разрыва большого диаметра. *Офтальмохирургия*.

- 2010; 1: 25–28.
20. Балашевич Л. И., Байбородов Я. В. Хирургическое лечение макулярных разрывов, вызванных лазерным повреждением фовеолы (клинический случай). Современные технологии лечения витреоретинальной патологии — 2013: материалы науч.-практ. конф. М., 2013; 27 с.
21. Файзрахманов Р. Р., Шишкин М. М., Павловский О. А., Ларина Е. А. Оперативное лечение макулярного разрыва. Уфа: Башк. энцикл., 2020; 144 с.
22. Захаров В. Д., Кислицина Н. М., Колесник С. В., Новиков С. В., Колесник А. И., Веселкова М. П. Современные подходы к хирургическому лечению сквозных идиопатических макулярных разрывов большого диаметра (обзор литературы). 2018; 3 (4): 64–70.

## References

- Aksenova SV, Hozina EA, Vasileva OA, Kumaksheva TN, Zotov RA. Makuljarnyj razryv: sovremennye aspekty jetiologii, diagnostiki i lechenija. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*. 2023; 2. Russian.
- Sen S, Udaya P, Maheshwari JJ, Ramasamy K, Kannan NB, Dharmalingam K. Profiling of idiopathic macular hole vitreous proteome identifies the role of extracellular matrix remodelling, epithelial-mesenchymal transformation and unfolded protein-response pathways. *Indian J Ophthalmol*. 2023; 71 (5): 2027–40.
- Nicolosi C, Vicini G, Bacherini D, Giattini D, Lombardi N, Esposito C, Rizzo S, Giansanti F. Non-Invasive Retinal Imaging Modalities for the Identification of Prognostic Factors in Vitreoretinal Surgery for Full-Thickness Macular Holes. *Diagnostics*. 2023; 13 (4): 589.
- Shukla D, Kalliath J, Srinivasan K, Neelakantan N, Rajendran A, Naresh KB, et al. Management of rhegmatogenous retinal detachment with coexisting macular hole: a comparison of vitrectomy with and without internal limiting membrane peeling. *Retina*. 2013; 33 (3): 571–78.
- Duker JS, Kaiser PK, Binder S, et al. The Internation Vitreomacular Traction Study Group classification of vitreomacular adhesion, traction, and macular hole. *Ophthalmology*. 2013; 120 (12): 2611–19.
- Bronskij DI, Zaika VA, Yakimov AP. Ocenka izmenenija jellipsoidnoj zony setchatki do i posle hirurgicheskogo lechenija skvoznyh makuljarnyh razryvov. *Oftal'mohirurgija*. 2023; 3: 72–77. Russian.
- Lachance A, You E, Garneau J, Bourgault S, Caissie M, Tourville E, Dirani A. Revision surgery for idiopathic macular hole after failed primary vitrectomy. *J Ophthalmol*. 2021; p. 1–7.
- Shkvorchenko DO, Krupina EA, Fomin AV. OKT-angiografija v ocenke rezul'tatov hirurgicheskogo lechenija makuljarnyh razryvov. *Oftal'mologija*. 2019; 16 (3): 310–6. Russian.
- Bronskij DI, Zhukova SI, Zaika VA, Shhuko AG. Ocenka stepeni vosstanovlenija struktury setchatki i horioretinal'nogo krovotoka posle hirurgicheskogo lechenija makuljarnyh razryvov bol'shogo diametra. *Acta biomecnica scienti ca*. 2021; 6 (6–1): 159–67. Russian.
- Stappler T, Montesel A, Konstantinidis L, Wolfensberger TJ, Eandi CM. Inverted internal limiting membrane flap technique for macular hole coexistent with rhegmatogenous retinal detachment. *Retina*. 2022; 42 (8): 1491–7.
- Zhao PP, Wang S, Liu N, Shu ZM, Zhao JS. A review of surgical outcomes and advances for macular holes. *J Ophthalmol*. 2018; p.1–10.
- Abouhoussein MA, Elbaha SM, Aboushousha M. Human amniotic membrane plug for macular holes coexisting with rhegmatogenous retinal detachment. *Clin Ophthalmol*. 2020; (14): 2411–6.
- Krupina EA. Hirurgicheskoe lechenie idiopaticeskogo makuljarnogo razryva s primeneniem bogatoj poluchaemoj plazmy krovi [dissertacija]. M., 2019. Russian.
- Popov EM, Kulikov AN, Churashov SV, Gavriljuk IO, Egorova EN, Abbasova AI. Sravnenie pokazatelej poluchaemoj raznymi sposobami autoplazmy, ispol'zuej dlja lechenija pacientov s makuljarnym razryvom. *Oftal'mologicheskie vedomosti*. 2021; 14 (4): 27–34. Russian.
- Arsjutov DG. Ispol'zovanie autologichnoj kondicionirovannoj plazmy, obogashhennoj trombocitami, v hirurgii regmatogennoj otslojki setchatki s central'nym i perifericheskimi razryvami. *Acta biomecnica scientifica*. 2019; 4 (4): 61–65. Russian.
- Bajborodov YaV, Zhogolev KS. Autologichnaja kondicionirovannaja plazma — inducirovannaja fibrinnaja plenka v hirurgicheskom lechenii makuljarnyh razryvov. *Sovremennye tehnologii v oftal'mologii*. 2020; (4): 283. Russian.
- Meuer SM, Myers CE, Klein BE, Swift MK, Huang Y, Gangaputra S, Pak JW, Danis RP, Klein R. The epidemiology of vitreoretinal interface abnormalities as detected by spectral-domain optical coherence tomography: the beaver dam eye study. *Ophthalmology*. 2015; 122 (4): 787–95.
- Bikbov MM, Altynbaev UR. Sposob hirurgicheskogo lechenija makuljarnogo razryva. Patent RF #2407493. 27.12.2010. Russian.
- Bikbov MM, Altynbaev UR, Gilmanshin TR, Chernov MS. Vybor sposoba intraoperacionnogo zakrytija idiopaticeskogo makuljarnogo razryva bol'shogo diametra. *Oftal'mohirurgija*. 2010; 1: 25–28. Russian.
- Balashевич LI, Bajborodov YaV. Hirurgicheskoe lechenie makuljarnyh razryvov, vyzvannyh lazernym povrezhdeniem foveoly (klinicheskij sluchaj). *Sovremennye tehnologii lechenija vitreoretinal'noj patologii 2013: materialy nauch.-prakt. konf. M., 2013; 27 s. Russian.*
- Fajzrahmanov RR, Shishkin MM, Pavlovskij OA, Larina EA. Operativnoe lechenie makuljarnogo razryva. Ufa: Bashk. jencikl., 2020; 144 s. Russian.
- Zaharov VD, Kislicina NM, Kolesnik SV, Novikov SV, Kolesnik AI, Veselkova MP. Sovremennye podhody k hirurgicheskomu lecheniju skvoznyh idiopaticeskikh makuljarnyh razryvov bol'shogo diametra (obzor literatury). 2018; 3 (4): 64–70. Russian.