

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)
М. Азизоглу, MD PhD (Стамбул, Турция)
Н. Н. Алипов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
В. К. Боженко, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)
Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)
Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)
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. РАН, д. м. н., 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)
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)
У. Н. Туманова, д. м. н. (Москва, 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)
А. И. Щеголев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

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

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru

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

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2023: 0,8

Журнал включен в WoS. JCR 2021: 0,5

Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 10

Scopus[®]

WEB OF SCIENCE™

Google
scholar

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0,14

Журнал включен в Перечень 31.01.2020 (№ 507)

Здесь находится открытый архив журнала

SJR
Scimago Journal & Country Rank

 **ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)**

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2024-05

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

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

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



Подписано в печать 31.10.2024

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

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc, 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)

Azizoglu M, MD PhD (Istanbul, Turkey)

Alipov NN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)

Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)

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)

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)

Tumanova UN, MD (Moscow, 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)

Schegolev AI, MD, professor (Moscow, Russia)

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

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

Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2023: 0,8

Scopus[®]

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0.14

SJR
Scimago Journal & Country Rank

Indexed in WoS. JCR 2021: 0.5

WEB OF SCIENCE[™]

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 507)



**ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)**

Five-year h-index is 10

Google
scholar

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2024-05

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

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

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



Approved for print 31.10.2024

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

МНЕНИЕ	4
<hr/>	
Дисбиоз кишечника и колоректальный рак: от гипотез онкогенеза к неинвазивной диагностике Е. В. Глазунова, А. С. Курносов, О. А. Злобовская	
Gut dysbiosis and colorectal cancer: from oncogenesis hypotheses to non-invasive diagnostics Glazunova EV, Kurnosov AS, Zlobovskaya OA	
МНЕНИЕ	8
<hr/>	
Выбор метода количественной оценки микробиоты кишечника: сравнительный анализ 16S NGS и ПЦР-РВ О. А. Злобовская, А. С. Курносов, А. Ф. Шептулина, Е. В. Глазунова	
Method for quantitative assesment of gut microbiota: a comparative analysis of 16S NGS and qPCR Zlobovskaya OA, Kurnosov AS, Sheptulina AF, Glazunova EV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	12
<hr/>	
Получение и оценка биологической активности экзогенной мРНК, кодирующей белок МхА человека М. А. Плотишкова, Д. Е. Бобков, С. А. Клотченко	
Production and biological activity of the exogenous mRNA encoding human MxA protein Plotnikova MA, Bobkov DE, Klotchenko SA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	20
<hr/>	
Изменение бактериального фитнеса в ходе экспериментальной адаптации <i>Pseudomonas aeruginosa</i> к колистину И. А. Маянский, Е. А. Бржозовская, Г. А. Скворцов-Игралов, С. В. Чаусова, И. В. Чеботарь	
Changes in bacterial fitness during the <i>Pseudomonas aeruginosa</i> experimental adaptation to colistin Mayanskiy NA, Brzhozovskaya EA, Skvortsov-Igralov GA, Chausova SV, Chebotar IV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	25
<hr/>	
Зависимость иммуногенности и реактогенности кандидатной мРНК-вакцины против туберкулеза от пола животных и дозы препарата В. В. Решетников, Г. С. Шепелькова, А. В. Рыбакова, А. П. Трашков, В. В. Еремеев, Р. А. Иванов	
The candidate anti-tuberculosis mRNA vaccine immunogenicity and reactogenicity dependency on the animal's sex and the vaccine dose Reshetnikov VV, Shepelkova GS, Rybakova AV, Trashkov AP, Yermeev VV, Ivanov RA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	32
<hr/>	
Генетические портреты хантов и манси по гаплогруппам Y-хромосомы в контексте генофондов России Г. Ю. Пономарев, А. Т. Агджоян, А. Ю. Потанина, Д. С. Адамов, Е. В. Балановская	
Genetic portraits of Khanty and Mansi based on the Y chromosome haplogroups in the context of gene pools of Russia Ponomarev GYu, Agdzhojan AT, Potanina AYu, Adamov DS, Balanovska EV	
МЕТОД	42
<hr/>	
Разработка кастомных баркодов для секвенирования на платформе MGI А. О. Шмитко, И. А. Булушева, Ю. А. Василиадис, О. Н. Сучалко, Д. С. Сырко, В. А. Белова, А. С. Павлова, Д. О. Коростин	
Designing of custom barcodes for sequencing on the MGI platform Shmitko AO, Bulusheva IA, Vasiladis IA, Suchalko ON, Syrko DS, Belova VA, Pavlova AS, Korostin DO	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	48
<hr/>	
Клинические популяционно-генетические исследования наследственных болезней среди детского населения Северной Осетии – Алании Р. А. Зинченко, И. С. Тебиева, В. В. Кадышев, А. Ф. Муртазина, А. О. Боровиков, А. В. Марахонов, А. В. Перепелов, З. К. Гетоева, С. И. Куцев	
Clinical population genetic studies of hereditary diseases in the pediatric population of North Ossetia – Alania Zinchenko RA, Tebieva IS, Kadyshv VV, Murtazina AF, Borovikov AO, Marakhonov AV, Perepelov AV, Getoeva ZK, Kutsev SI	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	57
<hr/>	
Новый рекомбинантный ингибитор РНКаз LoRI для применения <i>in vitro</i> Д. А. Сухов, И. В. Холошенко, Т. В. Петрова, Г. А. Романенко, М. Ю. Мышкин, В. Ю. Кост, Д. Ю. Трофимов, Н. Ю. Усман, Е. В. Барсова	
LoRI, a new recombinant RNase inhibitor for <i>in vitro</i> applications Sukhov DA, Kholoshenko IV, Petrova TV, Romanenko GA, Myshkin MYu, Kost VYu, Trofimov DYu, Usman NYu, Barsova EV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	65
<hr/>	
Нейровизуализационный подход для выявления биомаркеров рабочей памяти у больных с хронической ишемией мозга В. Ф. Фокин, Н. В. Пономарева, Р. Н. Коновалов, Р. Б. Медведев, А. И. Боровова, О. В. Лагода, М. В. Кротенкова, М. М. Танащян	
Neuroimaging approach to identification of working memory biomarkers in patients with chronic cerebral ischemia Fokin VF, Ponomareva NV, Konovalov RN, Medvedev RB, Boravova AI, Lagoda OV, Krotenkova MV, Tanashyan MM	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	73
<hr/>	
Морфофункциональное состояние криоконсервированных форменных элементов крови при умеренно низких температурах А. А. Власов, С. Ф. Андрусенко, Е. В. Денисова, А. Б. Эльканова, А. А. Каданова, Е. А. Мельченко, Н. Н. Сокульская, Д. А. Доменюк	
Morphofunctional state of cryopreserved blood cells at moderate low temperature Vlasov AA, Andrusenko SF, Denisova EV, Elkanova AB, Kadanova AA, Melchenko EA, Sokulskaya NN, Domenyuk DA	

ДИСБИОЗ КИШЕЧНИКА И КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК: ОТ ГИПОТЕЗ ОНКОГЕНЕЗА К НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Е. В. Глазунова, А. С. Курносов, О. А. Злобовская ✉

Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Колоректальный рак (КРР) — одно из самых распространенных злокачественных новообразований, занимающее лидирующие позиции по смертности от рака. Основная проблема КРР — диагностика заболевания на поздних стадиях (около 50% случаев выявляют на III и IV стадиях), что приводит к высокой летальности. Одним из ключевых факторов риска КРР являются дисбиотические нарушения кишечной микробиоты. С целью объяснить взаимосвязь дисбиоза и канцерогенеза были сформулированы три гипотезы возникновения КРР: «Alpha-bug», «Keystone pathogen hypothesis» и «Driver-Passenger». Модель «Driver-Passenger» наиболее перспективна и разделяет бактерии на «драйверы» рака, запускающие воспаление и повреждение клеток, и «бактерии-пассажиры», моделирующие микроокружение опухоли, усиливающие ее рост и усугубляющие дисбиоз. Драйверы и пассажиры могут выступать маркерами различных стадий онкогенеза. Колоноскопия поверхности прямой и ободочной кишки — наиболее эффективный метод для обнаружения КРР, в том числе на ранних стадиях заболевания. Однако повсеместное применение данной процедуры ограничивается связанным с ней дискомфортом для пациентов и риском возможных последствий. Неинвазивное исследование микробиоты на основе модели «Driver-Passenger» может стать безопасной и доступной альтернативой инвазивной диагностике в ходе профилактического скрининга, позволяя повысить выживаемость за счет вовлечения большего числа пациентов.

Ключевые слова: колоректальный рак, воспалительные заболевания кишечника, микробиота, микробиом, диагностика, гипотезы канцерогенеза, персонализированная медицина, неинвазивные исследования, выживаемость

Вклад авторов: Е. В. Глазунова — анализ литературы, сбор данных, написание рукописи; А. С. Курносов — редактирование рукописи; О. А. Злобовская — идея рукописи, редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Анатольевна Злобовская
ул. Погодинская, д. 10, с. 1, г. Москва, Россия, 119121; OZlobovskaya@cspfmba.ru

Статья получена: 15.10.2024 **Статья принята к печати:** 25.10.2024 **Опубликована онлайн:** 30.10.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.046

GUT DYSBIOSIS AND COLORECTAL CANCER: FROM ONCOGENESIS HYPOTHESES TO NON-INVASIVE DIAGNOSTICS

Glazunova EV, Kurnosov AS, Zlobovskaya OA ✉

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Colorectal cancer (CRC) is one of the most prevalent malignant neoplasms that occupies the leading position in terms of cancer mortality. The main problem of CRC is that the disease is diagnosed at the advanced stages (about 50% of cases identified are stage III and IV CRC), which results in high mortality. Dysbiotic gut microbiota alterations represent one of the key risk factors of CRC. Three hypotheses of CRC emergence were formulated in order to explain the relationship between dysbiosis and carcinogenesis: "alpha-bug", keystone pathogen, and driver-passenger hypotheses. The driver-passenger model is the most promising, it divides bacteria into "drivers" of cancer triggering inflammation and cell damage and the passenger bacteria modeling tumor microenvironment, accelerating tumor growth, and exacerbating dysbiosis. Drivers and passengers can be markers of various carcinogenesis stages. Colonoscopy involving examination of the surface of the rectum and colon is the most effective method to detect CRC, including the early stage disease. However, the wide use of this procedure is limited by the fact that it is associated with discomfort for patients and the risk of possible sequelae. Non-invasive microbiota assessment based on the driver-passenger model can become a safe and affordable alternative to the invasive diagnostics during preventive screening, since it makes it possible to improve survival rate due to involvement of a larger number of patients.

Keywords: colorectal cancer, inflammatory bowel diseases, microbiota, microbiome, diagnostics, carcinogenesis hypotheses, personalized medicine, non-invasive studies, survival

Author contribution: Glazunova EV — literature review, data acquisition, manuscript writing; Kurnosov AS — manuscript editing; Zlobovskaya OA — manuscript concept, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga A. Zlobovskaya
Pogodinskaya, 10, str. 1, Moscow, 119121, Russia; OZlobovskaya@cspfmba.ru

Received: 15.10.2024 **Accepted:** 25.10.2024 **Published online:** 30.10.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.046

Статистика КРР

Колоректальный рак (КРР) — это злокачественное новообразование различных отделов толстой или прямой кишки и один из наиболее распространенных видов патологических опухолевых процессов (10% от всех случаев рака) [1]. КРР занимает второе-третье место в ряду наиболее частых причин смертности от раковых заболеваний: около 1,1–2 млн новых случаев (600–935 тыс. смертей в год) [2].

По прогнозам, обнаружение новых случаев КРР в западных странах к 2030 г. составит 2,2 млн человек,

а к 2040 г. на 3,2 млн заболевших придется около 1,6 млн смертей ежегодно [1, 3]. Наибольшая смертность зарегистрирована в Восточной Европе [1]. Среди взрослых лиц моложе 50 лет отмечается тенденция к увеличению случаев КРР, особенно рака прямой и ободочной кишки, и последующих смертельных исходов [3, 4], что наряду с общей динамикой вызывает обеспокоенность.

Динамика заболеваемости КРР в Российской Федерации соответствует мировой тенденции. За период 2011–2021 гг. среднегодовой прирост обнаружения рака ободочной и прямой кишки составляет 2,14% и 1,47% соответственно [5]. За 2021 г. рак различных

отделов кишечника составил суммарно 12,2% от всех злокачественных новообразований [4]. Данный тренд можно объяснить не только истинным ростом заболеваемости, но и, вероятно, повышением качества скрининга [1].

Одновременно с ежегодным увеличением случаев КРР у лиц молодого возраста на 1–2,4%, наблюдается устойчивое снижение заболеваемости и смертности среди людей в возрасте ≥ 65 лет, что связано с повышением участия группы риска в регулярном профилактическом скрининге и еще раз подтверждает необходимость разработки новых стратегий ранней диагностики и профилактики [3, 4].

Прогноз течения и исхода заболевания зависит от диагностированной стадии. Приблизительно 50% случаев выявления КРР приходится совокупно на III и IV стадии заболевания, что приводит к высокой летальности в первый год после обнаружения [1, 4]. Ранняя диагностика опухоли (на стадиях 0, I или II) сопровождается 80%-й выживаемостью в течение пяти лет, которая снижается до 10% при более поздней диагностике [6].

Большинство случаев КРР имеют спорадический характер и только 20–30% обусловлены наследственными синдромами [3]. Превазирование случаев спорадического рака над наследственным косвенно подтверждает доминирование различных факторов окружающей среды как основной причины начала и развития канцерогенеза [2].

Факторы риска

Возникновение и развитие КРР — многофакторный и многоэтапный процесс, представляющий собой сложное взаимодействие окружающей среды, образа жизни, генетических, эпигенетических и других факторов [2]. Среди прочих факторов риска выделяют возраст, западный тип питания (особенно употребление большого количества красного мяса), курение, злоупотребление алкоголем, ожирение, диабет и воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) [3]. Дисбиотические нарушения микробиоты также рассматривают как ключевой фактор риска КРР. Ежегодно мировое научное сообщество публикует новые данные, подтверждающие патогенное и канцерогенное влияние дисбиотического микробного сообщества [2, 3, 6–10].

Дисбиоз стимулирует возникновение и развитие каскада разнообразных воспалительных реакций кишечника, вплоть до ВЗК, которые вместе с прямым воздействием патогенных и оппортунистических микроорганизмов признаны одной из основных причин КРР [2, 6]. Пациенты с диагностированным ВЗК имеют более высокий риск развития КРР: вероятность развития составляет 8,3–20% [11].

Таким образом, комплексный подход к изучению онкогенеза кишечника предполагает анализ трехстороннего взаимодействия между кишечной микробиотой, иммунной системой слизистой оболочки и эпителиальными клетками толстой кишки [7, 8].

Гипотезы КРР и микробиота

С целью понимания потенциального механизма канцерогенеза под влиянием микробиоты, а также развития дисбиотических нарушений в этом процессе, были последовательно предложены три модели: «Alpha-bug», «Keystone pathogen hypothesis» и «Driver-Passenger».

Модель «Alpha-bug»

В основу этой модели легла гипотеза, предложенная Sears CL и Pardoll DM и возникшая в результате исследований энтеротоксигенного подтипа *Bacteroides fragilis* (ETBF) [7]. Согласно модели, бактерии, обладающие уникальными факторами вирулентности, не только непосредственно запускают хроническое воспаление и канцерогенез и негативно воздействуют на иммунную систему, но и способствуют дисбиозу, вытесняя комменсальные бактерии, обладающие противоопухолевым действием. Такие бактерии получили название «альфа-жуки» (alpha-bugs).

Различные исследователи дополняли модель «Alpha-bug» следующими таксонами: *Escherichia coli* pks+, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium* spp., *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*S. bovis* biotype I) [2].

Модель «Keystone pathogen hypothesis»

В рамках своей модели Hajishengallis G. и соавторы указывают на несколько недостатков гипотезы «Alpha-bug»: смещение фокуса только на отдельные токсигенные виды, исключение из рассмотрения влияния комменсалов (т. е. отсутствие комплексного подхода), анализ онкогенеза начиная с дисбиотической стадии. Предложенная ими модель рассматривает «ключевых» бактерий, степень воздействия которых на организм хозяина непропорционально превышает их численность. Эти «ключевые» минорные бактерии влияют на гомеостаз, на состав микробиоты, инициируют воспалительные процессы и дисбиоз. Гипотеза дополняет список организмов, входящих в модель «Alpha-bug», следующими видами: *B. thetaiotaomicron*, *Citrobacter rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Methanobrevibacter smithii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Proteus mirabilis* [10].

Модель «Driver-Passenger»

Модель «Driver-Passenger», предложенная Tjalsma H. и соавторами, расширяет и объединяет первые две концепции, рассматривая канцерогенез как сложный процесс, индуцируемый бактериями-драйверами (drivers) и прогрессирующий под влиянием бактерий-пассажиров (passengers). Драйверы вызывают воспаление и повреждение клеток эпителия, способствуя началу КРР, и создают благоприятную среду для развития оппортунистических и комменсальных пассажиров. Пассажиры более адаптированы к среде микроокружения опухоли, способствуют дальнейшему прогрессированию канцерогенеза, могут подавлять рост драйверов и усугублять дисбиотические нарушения микробиоты [12].

Функциональная роль бактерий-драйверов демонстрирует значительное сходство с характеристиками alpha-bug и «keystone» бактерий, что ожидаемо предполагает общих кандидатов. В качестве таких бактерий исследователи предлагают: *B. thetaiotaomicron*, *Bifidobacterium bifidum*, *E. coli* (филотип B2 и pks+), *E. faecalis*, *Eubacterium rectale*, ETBF, *P. endodontalis*, *Ruminococcus gnavus*; *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp.; *Enterobacteriaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Ruminococcaceae*.

Таксоны *Clostridium septicum*, *P. gingivalis*, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *Proteus* spp., *Fusobacterium* spp., а также другие патотипы *E. coli* можно выделить в отдельную подгруппу «driver-passenger», так как они сочетают

свойства обеих групп. Например, виды *Fusobacterium spp.* имеют высокое сродство к эпителиальным клеткам кишечника, в особенности к клеткам опухоли. *F. nucleatum* способен формировать биопленки в том числе и с другими видами, например *C. difficile*, *Candida albicans*, *E. faecalis*, *P. gingivalis*, *Streptococcus spp.* [3].

С поздними стадиями канцерогенеза ассоциирована группа, выполняющая функцию пассажиров: *Akkermansia muciniphila*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *P. stomatis*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Aspergillus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Collinsella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Mucor spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Prevotella spp.*, *Roseburia spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Veillonella spp.*; *Streptococcaceae*. И драйверы, и пассажиры обнаруживают доказанные ассоциации с определенными этапами и механизмами канцерогенеза, с повышенным уровнем различных интерлейкинов и Th17-опосредованным иммунным ответом, с некоторыми подтипами КРР, с мутационным статусом опухолевых клеток и клеток аденом [3, 13].

На сегодняшний день модель «Driver-Passenger» — комплексная концепция, наиболее приближенно отражающая динамические, функциональные и временные взаимодействия внутри микробного сообщества на различных этапах КРР, в сравнении с другими гипотезами. Ограничения данной модели состоят в гетерогенности и многофункциональности микробиоты, состав и количество которой вариативны в зависимости от многих факторов, и не учитывают на данный момент влияния комменсальных видов архей и паразитарных инфекций [12].

Дальнейшие исследования помогут уточнить микробиом-ассоциированные механизмы развития и прогрессии КРР для создания более универсальной модели онкогенеза.

Дисбиотические нарушения археома

Археи (Archaea) — минорные комменсальные представители микробиома, метаболизирующие различные соединения, которые образуются в процессе анаэробного разложения органических веществ бактериями кишечника. В течение всего онкогенеза наблюдается дисбиоз археома: истощение метаногенной составляющей и увеличение содержания галофильных видов [14]. Роль архей требует дальнейшего изучения в контексте гипотезы «Driver-Passenger».

Паразитарная инфекция как драйвер КРР

К распространенным паразитарным инвазиям желудочно-кишечного тракта относятся: амебиаз (*Entamoeba*

histolytica), аскаридоз (*Ascaris lumbricoides*), балантидиаз (*Balantidium coli*), бластоцистоз (*Blastocystis spp.*), криптоспоридиоз (*Cryptosporidium sp.*), лямблиоз (*Giardia lamblia*), стронгилоидоз (*Strongyloides sp.*), трихоцефалез (*Trichuris trichiura*), цистоизоспороз (*Cystoisospora belli*), циклоспориаз (*Cyclospora cayentanensis*), шистосомоз (*Schistosoma sp.*), энтеробиоз (*Enterobius vermicularis*). Некоторых из них классифицируют как нормобиоту, однако в подавляющем большинстве данные организмы доказанно влияют на развитие воспаления и дисбиоза. Они выделяют токсичные метаболиты, изменяют pH, конкурируют за ресурсы, иницируют иммунный ответ, увеличивают проницаемость стенки кишечника и влияют на баланс между симбионтами и патогенами (даже после терапии). Таким образом, они могут функционировать как драйверы, что требует дальнейшего анализа [15].

Диагностика КРР

В связи со статистикой КРР, разработка новых стратегий ранней диагностики и профилактики становится все более актуальной задачей современной медицины.

Физикальное обследование, диагностическая визуализация, эндоскопический осмотр, анализ биопсии и исследование кала на скрытую кровь являются основными методами диагностики и выявления КРР. На сегодняшний день колоноскопия — лучший способ раннего обнаружения КРР [1]. Однако инвазивность этой процедуры ограничивает ее широкое применение.

В контексте приведенных данных состояние микробиоты кишечника можно рассматривать как альтернативный диагностический и прогностический маркер КРР. Анализ микробиоты может помочь в решении о необходимости колоноскопии, а также в определении стадии заболевания, возможности неблагоприятного развития, исхода и формирования метастазов [7, 9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неинвазивное исследование микробиоты кишечника, базирующееся на модели «Driver-Passenger», — удобный и безопасный профилактический метод первичной диагностики, повышающий вероятность положительного исхода в случае обнаружения дисбиотических нарушений и выявления КРР по следам данного скрининга. Его повсеместное применение в медицинской практике может способствовать снижению заболеваемости и смертности за счет увеличения потока желающих пройти скрининг. Разработка подобных неинвазивных методов диагностики является актуальным социально значимым направлением.

Литература

- World Health Organization. 2024. World Health Organization. Available from: <https://www.who.int/>
- Yu YN, Fang JY. Gut Microbiota and Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Tumors*. 2015; 2 (1): 26–32.
- Cheng Y, Ling Z, Li L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 2020; 11: 615056.
- Bakulin IG, Zharkov AV, Zhuravleva MS, Serkova MYu. Colorectal cancer screening: current status and future prospects. *Profil Meditsina*. 2023; 26 (12): 12.
- Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024; 276 р. Доступно по ссылке: <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2024/08/zis-2023-elektronnaya-versiya.pdf>.
- Saus E, Iraola-Guzmán S, Willis JR, Brunet-Vega A, Gabaldón T. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. *Mol Aspects Med*. 2019; 69: 93–106.
- Sears CL, Pardoll DM. Perspective: Alpha-Bugs, Their Microbial Partners, and the Link to Colon Cancer. *J Infect Dis*. 2011; 203 (3): 306–11.

8. Yadav D, Sainatham C, Filippov E, Kanagala SG, Ishaq SM, Jayakrishnan T. Gut Microbiome–Colorectal Cancer Relationship. *Microorganisms*. 2024; 12 (3): 484.
9. Wang Z, Dan W, Zhang N, Fang J, Yang Y. Colorectal cancer and gut microbiota studies in China. *Gut Microbes*. 2023; 15 (1): 2236364.
10. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10 (10): 717–25.
11. Eaden JA. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001; 48 (4): 526–35.
12. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10 (8): 575–82.
13. Li J, Zhang A hua, Wu F fang, Wang X jun. Alterations in the Gut Microbiota and Their Metabolites in Colorectal Cancer: Recent Progress and Future Prospects. *Front Oncol*. 2022; 12: 841552.
14. Coker OO, Wu WKK, Wong SH, Sung JJY, Yu J. Altered Gut Archaea Composition and Interaction With Bacteria Are Associated With Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2020; 159 (4): 1459-1470.e5.
15. Abdel Hamed EF, Mostafa NE, Farag SM, Ibrahim MN, Ibrahim BH, Rashed HE, et al. Human protozoa infection and dysplasia in ulcerative colitis: a neglected aspect in a prominent disease. *Parasitol Res*. 2023; 122 (11): 2709–18.

References

1. World Health Organization. 2024. World Health Organization. Available from: <https://www.who.int/>
2. Yu YN, Fang JY. Gut Microbiota and Colorectal Cancer. *Gastrointest Tumors*. 2015; 2 (1): 26–32.
3. Cheng Y, Ling Z, Li L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 2020; 11: 615056.
4. Bakulin IG, Zharkov AV, Zhuravleva MS, Serkova MYu. Colorectal cancer screening: current status and future prospects. *Profil Meditsina*. 2023; 26 (12): 12.
5. Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2023 godu (zabolevaemost' i smertnost'). M.: MNIOL im. P. A. Gercena — filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii, 2024; 276 p. Dostupno po ssylke: <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2024/08/zis-2023-elektronnaya-versiya.pdf>. Russian.
6. Saus E, Iraola-Guzmán S, Willis JR, Brunet-Vega A, Gabaldón T. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. *Mol Aspects Med*. 2019; 69: 93–106.
7. Sears CL, Pardoll DM. Perspective: Alpha-Bugs, Their Microbial Partners, and the Link to Colon Cancer. *J Infect Dis*. 2011; 203 (3): 306–11.
8. Yadav D, Sainatham C, Filippov E, Kanagala SG, Ishaq SM, Jayakrishnan T. Gut Microbiome–Colorectal Cancer Relationship. *Microorganisms*. 2024; 12 (3): 484.
9. Wang Z, Dan W, Zhang N, Fang J, Yang Y. Colorectal cancer and gut microbiota studies in China. *Gut Microbes*. 2023; 15 (1): 2236364.
10. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10 (10): 717–25.
11. Eaden JA. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001; 48 (4): 526–35.
12. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10 (8): 575–82.
13. Li J, Zhang A hua, Wu F fang, Wang X jun. Alterations in the Gut Microbiota and Their Metabolites in Colorectal Cancer: Recent Progress and Future Prospects. *Front Oncol*. 2022; 12: 841552.
14. Coker OO, Wu WKK, Wong SH, Sung JJY, Yu J. Altered Gut Archaea Composition and Interaction With Bacteria Are Associated With Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2020; 159 (4): 1459-1470.e5.
15. Abdel Hamed EF, Mostafa NE, Farag SM, Ibrahim MN, Ibrahim BH, Rashed HE, et al. Human protozoa infection and dysplasia in ulcerative colitis: a neglected aspect in a prominent disease. *Parasitol Res*. 2023; 122 (11): 2709–18.

ВЫБОР МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ 16S NGS И ПЦР-РВ

О. А. Злобовская¹ ✉, А. С. Курносов¹, А. Ф. Шептулина², Е. В. Глазунова¹

¹ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

В последнее время наблюдается значительная коммерциализация услуг по количественной оценке микробиоты кишечника с целью диагностики дисбиоза — нарушения микробного баланса. В условиях растущего интереса к персонализированным подходам в медицине и профилактической терапии диагностика дисбиоза приобретает все большее значение. Результаты подобного скрининга используют для рекомендаций по коррективке питания, изменению образа жизни или, при необходимости, назначения медикаментозного лечения. Для подобной оценки необходим надежный и точный метод оценки микробиоты, поскольку от качества полученных данных зависит корректность последующих рекомендаций и терапевтических вмешательств. В статье рассмотрены основные аспекты двух подходов, применяемых для количественной оценки микробиоты, — высокопроизводительного секвенирования гена 16S рНК (16S NGS) и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), а также представлены их сильные, на наш взгляд, и слабые стороны.

Ключевые слова: 16S NGS, ПЦР-РВ, метагеномный анализ, количественный анализ, микробиом, персонализированная медицина

Вклад авторов: О. А. Злобовская — идея, анализ литературы, написание рукописи; А. С. Курносов, А. Ф. Шептулина, Е. В. Глазунова — редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Анатольевна Злобовская
ул. Погодинская, д. 10, с. 1, г. Москва, 119121, Россия; OZlobovskaya@cspfmba.ru

Статья получена: 15.10.2024 **Статья принята к печати:** 25.10.2024 **Опубликована онлайн:** 30.10.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.047

METHOD FOR QUANTITATIVE ASSESMENT OF GUT MICROBIOTA: A COMPARATIVE ANALYSIS OF 16S NGS AND qPCR

Zlobovskaya OA¹ ✉, Kurnosov AS¹, Sheptulina AF², Glazunova EV¹

¹ Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

Recently, considerable commercialization of services for quantification of gut microbiota aimed to diagnose dysbiosis, the microbial imbalance, is observed. In the context of growing interest to the personalized approaches in medicine and preventive therapy, the diagnosis of dysbiosis is becoming increasingly important. The results of such screening are used to adjust guidelines on correction of the diet, lifestyle modification, or, where necessary, drug therapy prescription. Such assessment requires a reliable and accurate method for evaluation of microbiota, since validity of further recommendations and therapeutic interventions depends on the quality of the data obtained. The paper reports the main aspects of the two approaches used for microbiota quantification: 16S rRNA next-generation sequencing (16S NGS) and real-time PCR (qPCR). The strengths (from our perspective) and weaknesses of the approaches are also provided.

Keywords: 16S NGS, real-time PCR, metagenomic analysis, quantitative analysis, microbiome, personalized medicine

Author contribution: Zlobovskaya OA — concept, literature review, manuscript writing; Kurnosov AS, Sheptulina AF, Glazunova EV — manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga A. Zlobovskaya
Pogodinskaya, 10, str. 1, Moscow, 119121, Russia; OZlobovskaya@cspfmba.ru

Received: 15.10.2024 **Accepted:** 25.10.2024 **Published online:** 30.10.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.047

16S NGS: широкие возможности и значительные ограничения

Метод 16S NGS стал важным инструментом для изучения микробиоты благодаря возможности параллельного секвенирования множества образцов и выявления широкого спектра микроорганизмов. Он позволяет проводить комплексную оценку таксономического состава микробного сообщества и его разнообразия, что делает этот метод незаменимым для фундаментальных исследований. Однако, несмотря на потенциал, этот метод имеет ряд следующих серьезных ограничений, которые приводят к искажению результатов количественной оценки.

Неравномерная амплификация (зависимость от праймеров)

Для амплификации переменных регионов гена 16S рНК используют универсальные праймеры. Они обладают разным сродством к ДНК различных таксонов, что приводит к неравной эффективности амплификации в

процессе изготовления библиотек [1]. В результате этого искажаются данные о структуре микробиоты, так как одни таксоны могут быть переоценены, а другие — недооценены или вовсе пропущены.

Неравномерная амплификация (зависимость от количественного состава)

Наиболее представленные таксоны получают значительное преимущество на ранних этапах амплификации [2], что снижает вероятность точного определения редких таксонов (до 10% от общего количества). Поскольку каждый образец имеет уникальный состав микробиоты, невозможно применить единую систематическую коррективку для всех образцов даже при использовании одинаковых протоколов [3, 4].

Низкая чувствительность

При использовании метода 16S NGS для каждого образца в среднем получают от пяти до 50 тыс. прочтений. Однако,

согласно Пуассоновскому распределению, количественную оценку таксона можно считать статистически корректной только при наличии как минимум 100 прочтений данного таксона в образце [5]. Это ограничивает возможность достоверной оценки таксонов, которые составляют менее 0,2–2% от общего числа ридов (в зависимости от суммарного числа прочтений). Увеличение числа прочтений в образце не всегда целесообразно, так как амплификация доминирующих таксонов происходит на ранних этапах, что приводит к значительной недооценке минорных таксонов или их полному исчезновению из анализа. Как следствие, кривая насыщения таксономического разнообразия достигает плато при 20–50 тыс. прочтений, и дальнейшее увеличение числа ридов не повысит репрезентативность данных. Это особенно актуально для минорных условно-патогенных микроорганизмов, которые могут иметь клиническое значение при низких концентрациях, но часто либо не обнаруживаются, либо их количественная оценка оказывается ненадежной. Кроме того, среди исследователей нет единого мнения по вопросу: что более корректно — сравнивать образцы с различным числом прочтений или вводить искажения при унификации их количества [6, 7].

Сниженная специфичность

При исследовании отдельных регионов (V1-V3, V3-V4, V6, и т. д.) высокая степень консерватизма региона 16S в ряде случаев не позволяет получить таксономическое разрешение на уровне видов, а иногда и родов [1, 8]. Использование полной последовательности гена 16S увеличивает разрешающую способность секвенирования, но доступно только на платформах ONT, PacBio и LoopSeq. К существенным недостаткам данных платформ можно отнести более высокую частоту ошибок относительно ошибок при коротких прочтениях, получаемых, например, на платформе Illumina.

Ограниченность относительной оценки таксонов

Метод 16S NGS оценивает только относительное содержание таксонов, а не их абсолютное количество. Это означает, что увеличение представленности одного таксона, например, вследствие внедрения изменений в рацион, автоматически приведет к уменьшению доли других при анализе методом 16S NGS. При одновременном изменении нескольких таксонов в сторону уменьшения/увеличения восстановить истинную картину динамики не представляется возможным [4–6].

Влияние количества копий гена 16S рPHK

Каждый вид микроорганизмов обладает уникальным количеством копий гена 16S рPHK, что редко учитывают при анализе, особенно при идентификации последовательности до уровня родов или семейств. Даже в случае использования специализированного плагина для QIIME 2 искажения, как правило, сохраняются. Причина в том, что при отсутствии данных о копиях гена для конкретной таксономической группы базе данных *rmDB* алгоритм автоматически присваивает значение копияности, равное единице.

Неравная филогенетическая разрешающая способность

Разные регионы гена 16S рPHK имеют различную филогенетическую разрешающую способность [1, 8–10].

Это приводит к неравномерной точности классификации таксонов, что создает дополнительные трудности при сопоставлении данных из разных исследований.

Различия в платформах секвенирования и методах обработки данных

Разные платформы секвенирования и методы подготовки библиотек могут приводить к значительным различиям в результатах [1, 11, 12]. Как было сказано выше, это усложняет сопоставление данных между различными исследованиями.

Зависимость от базы данных

Разные базы данных (RDP, SILVA, Greengenes и т. д.) могут давать разные количественные оценки одного и того же образца [1, 13]. Кроме того, базы обновляют раз в несколько лет, из-за чего в них могут отсутствовать недавно введенные таксономические единицы.

ПЦР-РВ: специализированные задачи, высокая точность

В отличие от NGS, метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) основан на амплификации специфических фрагментов ДНК. Из этого следует ряд его преимуществ.

Высокая чувствительность и широкий количественный диапазон оценки

ПЦР-РВ предоставляет возможность обнаруживать и количественно оценивать от нескольких копий мишени в реакции с высокой точностью. Это особенно важно при исследовании редких клинически значимых таксонов, которые могут быть пропущены при 16S NGS. Метод ПЦР-РВ позволяет достоверно количественно определить до 107–108 копий мишени в реакции.

Высокая специфичность

Олигонуклеотиды подбирают таким образом, чтобы с высокой точностью отличить даже близкородственные микроорганизмы.

Повышенная точность

В отличие от 16S NGS, за счет отсутствия одновременной амплификации нескольких сотен разных мишеней индивидуальная оценка содержания определенного таксона более достоверна.

Быстрая и простая интерпретация

В отличие от 16S NGS, ПЦР-РВ не требует сложных биоинформатических методов для интерпретации данных. Это делает его более удобным и доступным для клинических исследований и диагностики, где важна скорость и точность результатов.

Высокая воспроизводимость

Метод ПЦР-РВ обладает более высокой степенью воспроизводимости по сравнению с 16S NGS благодаря

простоте метода и анализа результатов, что особенно важно для клинической диагностики и долгосрочных исследований. Этот фактор также облегчает сравнение данных между различными исследованиями и лабораториями.

Абсолютная количественная оценка

В отличие от относительного подхода NGS, ПЦР-РВ предоставляет возможность как для относительной, так и для абсолютной количественной оценки таксонов. Это позволяет анализировать динамику содержания микробиоты при различных состояниях.

Сниженная зависимость от качества биоматериала

Анализ методом ПЦР-РВ менее требователен к исходному качеству образца (количество, содержание ингибиторов ПЦР) по сравнению с методом 16S NGS, где данные факторы существенно влияют на предварительный этап подготовки библиотек.

Тем не менее метод ПЦР-РВ также обладает определенными ограничениями. Однако в отличие от ограничений, присущих методу NGS, большинство из них можно свести к минимуму при условии учета и коррекции следующих возможных проблемных аспектов.

Выбор целевых микроорганизмов

ПЦР-РВ ориентирована на амплификацию заранее выбранных генетических мишеней, что требует предварительного знания о ключевых представителях микробиоты в данном исследовании.

Выбор региона для разработки систем

Наиболее исследованным регионом для большинства бактерий является ген 16S РНК, поэтому чаще всего именно он является мишенью для разработки систем. Однако это высококонсервативная область генома, поэтому не для всех таксономических единиц на уровне видов (а иногда и родов, например, *Oscillibacter* / *Dysosmobacter*) возможно разработать специфичные системы, амплифицирующие данный регион. Для ряда микроорганизмов есть полногеномные данные, позволяющие выбрать другой регион для детекции. Однако таких организмов меньшинство, поэтому выбранная мишень может быть неспецифичной или система будет амплифицировать не всех представителей данной таксономической группы.

Литература

1. Abellan-Schneyder I, Matchado MS, Reitmeier S, Sommer A, Sewald Z, Baumbach J, et al. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. Tringe SG, editor. mSphere. 2021; 6 (1): e01202–20.
2. Gonzalez JM, Portillo MC, Belda-Ferre P, Mira A. Amplification by PCR Artificially Reduces the Proportion of the Rare Biosphere in Microbial Communities. Gilbert JA, editor. PLoS ONE. 2012; 7 (1): e29973.
3. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019; 38 (6): 1059–70.
4. Vaginal Microbiome Consortium (additional members), Brooks JP,

Ограничение одновременного количества исследуемых таксонов

Поскольку ПЦР-РВ направлена на специфичную амплификацию фрагментов ДНК, количество одновременно анализируемых таксонов ограничено. Для точной количественной оценки желательно совмещать не более двух мишеней (при широком возможном диапазоне и стабильном присутствии обеих в большинстве образцов) или трех мишеней (для редких таксонов) в пробирке. Кроме того, из-за ограниченного суммарного числа таксонов в анализе, метод ПЦР-РВ не предоставляет информацию о структуре всего микробного сообщества или его разнообразии, которые также могут обладать клинической значимостью.

Искажения, связанные с количеством копий генов

Данная проблема может возникнуть, если система подобрана для детекции таксономической группы на высоком уровне (например, семейства) и внутри группы разные роды / виды обладают существенно различающимся количеством копий гена 16S.

Необходимость стандартизации данных

Для перевода данных, полученных с помощью ПЦР-РВ, в абсолютные значения требуется использование калибровочных стандартов. Для максимальной точности ПЦР-РВ используемые стандарты необходимо предварительно оценивать методом капельно-цифровой ПЦР. При этом чувствительность и линейный диапазон олигонуклеотидных систем крайне желательно исследовать не на модельных образцах (например, титровке плазмиды или ампликона), а на геномной ДНК соответствующего таксона, предпочтительно на фоне фекальной ДНК в клинически релевантном количестве.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение особенностей методов 16S NGS и ПЦР-РВ показывает, что NGS лучше подходит для исследования общего состава микробиоты и ее разнообразия, в то время как его использование для количественной оценки ограничено рядом проблем, которые на текущий момент не имеют практического решения. В то же время ПЦР-РВ обеспечивает более точную и надежную количественную оценку, что делает его предпочтительным методом для исследований, где важна высокая точность, а исследуемые маркеры известны.

5. Edwards DJ, Harwich MD, Rivera MC, Fettweis JM, et al. The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. BMC Microbiol. 2015; 15 (1): 66.
6. Barlow JT, Bogatyrev SR, Ismagilov RF. A quantitative sequencing framework for absolute abundance measurements of mucosal and luminal microbial communities. Nat Commun. 2020; 11 (1): 2590.
7. Vandeputte D, Kathagen G, D'hoë K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. Nature. 2017; 551 (7681): 507–11.
8. Nearing JT, Douglas GM, Hayes MG, MacDonald J, Desai DK, Allward N, et al. Microbiome differential abundance methods

- produce different results across 38 datasets. *Nat Commun.* 2022; 13 (1): 342.
8. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 5029.
 9. Rintala A, Pietilä S, Munukka E, Eerola E, Pursiheimo JP, Laiho A, et al. Gut Microbiota Analysis Results Are Highly Dependent on the 16S rRNA Gene Target Region, Whereas the Impact of DNA Extraction Is Minor. *J Biomol Tech JBT.* 2017; 28 (1): 19–30.
 10. Kameoka S, Motooka D, Watanabe S, Kubo R, Jung N, Midorikawa Y, et al. Benchmark of 16S rRNA gene amplicon sequencing using Japanese gut microbiome data from the V1–V2 and V3–V4 primer sets. *BMC Genomics.* 2021; 22 (1): 527.
 11. Tremblay J, Singh K, Fern A, Kirton ES, He S, Woyke T, et al. Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Front Microbiol.* 2015; 6.
 12. Chuang HH, Huang CG, Chou SH, Li HY, Lee CC, Lee LA. Comparative analysis of gut microbiota in children with obstructive sleep apnea: assessing the efficacy of 16S rRNA gene sequencing in metabolic function prediction based on weight status. *Front Endocrinol.* 2024; 15: 1344152.
 13. Ceccarani C, Severgnini M. A comparison between Greengenes, SILVA, RDP, and NCBI reference databases in four published microbiota datasets. 2023 [cited 2024 Oct 4]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.04.12.535864>.

References

1. Abellan-Schneyder I, Matchado MS, Reitmeier S, Sommer A, Sewald Z, Baumbach J, et al. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. Tringe SG, editor. *mSphere.* 2021; 6 (1): e01202–20.
2. Gonzalez JM, Portillo MC, Belda-Ferre P, Mira A. Amplification by PCR Artificially Reduces the Proportion of the Rare Biosphere in Microbial Communities. Gilbert JA, editor. *PLoS ONE.* 2012; 7 (1): e29973.
3. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019; 38 (6): 1059–70.
4. Vaginal Microbiome Consortium (additional members), Brooks JP, Edwards DJ, Harwich MD, Rivera MC, Fettweis JM, et al. The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. *BMC Microbiol.* 2015; 15 (1): 66.
5. Barlow JT, Bogatyrev SR, Ismagilov RF. A quantitative sequencing framework for absolute abundance measurements of mucosal and lumenal microbial communities. *Nat Commun.* 2020; 11 (1): 2590.
6. Vandeputte D, Kathagen G, D'hoë K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature.* 2017; 551 (7681): 507–11.
7. Nearing JT, Douglas GM, Hayes MG, MacDonald J, Desai DK, Allward N, et al. Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nat Commun.* 2022; 13 (1): 342.
8. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 5029.
9. Rintala A, Pietilä S, Munukka E, Eerola E, Pursiheimo JP, Laiho A, et al. Gut Microbiota Analysis Results Are Highly Dependent on the 16S rRNA Gene Target Region, Whereas the Impact of DNA Extraction Is Minor. *J Biomol Tech JBT.* 2017; 28 (1): 19–30.
10. Kameoka S, Motooka D, Watanabe S, Kubo R, Jung N, Midorikawa Y, et al. Benchmark of 16S rRNA gene amplicon sequencing using Japanese gut microbiome data from the V1–V2 and V3–V4 primer sets. *BMC Genomics.* 2021; 22 (1): 527.
11. Tremblay J, Singh K, Fern A, Kirton ES, He S, Woyke T, et al. Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Front Microbiol.* 2015; 6.
12. Chuang HH, Huang CG, Chou SH, Li HY, Lee CC, Lee LA. Comparative analysis of gut microbiota in children with obstructive sleep apnea: assessing the efficacy of 16S rRNA gene sequencing in metabolic function prediction based on weight status. *Front Endocrinol.* 2024; 15: 1344152.
13. Ceccarani C, Severgnini M. A comparison between Greengenes, SILVA, RDP, and NCBI reference databases in four published microbiota datasets. 2023 [cited 2024 Oct 4]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.04.12.535864>.

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКЗОГЕННОЙ мРНК, КОДИРУЮЩЕЙ БЕЛОК МxА ЧЕЛОВЕКА

М. А. Плотникова¹, Д. Е. Бобков^{1,2}, С. А. Клотченко¹✉

¹ Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева Министерства здравоохранения России, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Индукцируемый интерферонами типа I и типа III человеческий белок МxА является важным медиатором врожденного иммунитета и проявляет антивиральную активность в отношении широкого спектра РНК- и ДНК-содержащих вирусов. По последним данным, сверхэкспрессия белка МxА повышает чувствительность к проводимой химиотерапии и является одним из факторов благоприятного прогноза для пациентов с раком молочной железы. Экзогенная мРНК, способная к внутриклеточной продукции белка МxА, не только обладает потенциалом для лечения респираторных вирусных инфекций, но и может стать важным инструментом для фундаментальных исследований. Целью работы было сконструировать и получить методом *in vitro* транскрипции (IVT) экзогенную мРНК, кодирующую функциональный цитоплазматический белок МxА человека; изучить ее трансляционные свойства; оценить и выявить закономерности в экспрессии некоторых генов системы интерферонов в ответ на введение этой экзогенной мРНК в клетки. В результате работы были успешно сконструированы и получены методом IVT экзогенные мРНК (в количествах до 200 мкг), способные к эффективной трансляции (до 20 нг/мл белка со 100 нг мРНК в лунке 96-луночного планшета) в эукариотических клеточных системах; подтверждено диффузное внутриклеточное распределение белка МxА в клетках MDCK; выявлены достоверные изменения экспрессии интерферон-стимулируемых генов, таких как OAS1, PKR (EIF2AK2), MDA5, RIG-I. Наши дальнейшие исследования будут посвящены оценке терапевтического потенциала разработанных экзогенных мРНК в отношении вирусов гриппа А и В, респираторно-синцитиального вируса и коронавируса SARS-CoV-2.

Ключевые слова: белок МxА, экзогенная мРНК, *in vitro* транскрипция, ИФН-стимулируемые гены

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, Соглашение № 23-25-00433, название проекта: «Изучение противовирусного действия мРНК, кодирующей МxА белок человека» (руководитель — М. А. Плотникова), <https://rscf.ru/project/23-25-00433/>

Вклад авторов: М. А. Плотникова — дизайн исследования, проведение экспериментов, анализ результатов, статистическая обработка, написание рукописи; Д. Е. Бобков — исследования с использованием метода конфокальной микроскопии; С. А. Клотченко — получение и характеристика препаратов экзогенных мРНК, редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Сергей Анатольевич Клотченко
ул. Профессора Попова, 15/17, г. Санкт-Петербург, 197022, Россия; fosfatik@mail.ru

Статья получена: 30.09.2024 **Статья принята к печати:** 22.10.2024 **Опубликована онлайн:** 30.10.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.048

PRODUCTION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE EXOGENOUS mRNA ENCODING HUMAN MxA PROTEIN

Plotnikova MA¹, Bobkov DE^{1,2}, Klotchenko SA¹✉

¹ Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

² Institute of Cytology, Russian Academy of Science, St. Petersburg, Russia

Human MxA protein induced by type I and III interferons is an important innate immunity mediator, it shows antiviral activity against a broad spectrum of RNA and DNA viruses. According to the latest data, the MxA protein overexpression increases chemotherapy sensitivity and represents one of the favorable prognostic factors in patients with breast cancer. The exogenous mRNA capable of intracellular MxA protein production not only has the potential for treatment of viral respiratory infection, but also can become an important fundamental research tool. The study aimed to construct and produce the exogenous mRNA encoding the functional human cytoplasmic MxA protein by *in vitro* transcription (IVT); to study its translational properties; to assess and identify the patterns of the expression of some interferon system genes in response to introduction of this exogenous mRNA into cells. As a result of the study, the exogenous mRNAs capable of effective translation (up to 20 ng/mL of protein from 100 ng of mRNA per well of the 96-well plate) in the eukaryotic cell systems were successfully constructed and produced by IVT (in the amount of up to 200 µg); diffuse distribution of the MxA protein in the MDCK cells was confirmed; significant changes in the expression of the interferon-stimulated genes, such as OAS1, PKR (EIF2AK2), MDA5, RIG-I, were revealed. Our further research will be focused on assessing the developed exogenous mRNAs' therapeutic potential against influenza A and B viruses, respiratory syncytial virus, and coronavirus SARS-CoV-2.

Keywords: MxA protein, exogenous mRNA, *in vitro* transcription, IFN-stimulated genes

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation, Agreement No. 23-25-00433, project title: "Assessment of antiviral effect of the mRNA encoding human MxA protein" (manager M.A. Plotnikova), <https://rscf.ru/project/23-25-00433/>

Author contribution: Plotnikova MA — study design, experimental procedure, analysis of the results, statistical processing, manuscript writing; Bobkov DE — confocal microscopy examination; Klotchenko SA — production and characterization of the exogenous mRNA preparations, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sergey A. Klotchenko
Professora Popova, 15/17, St. Petersburg, 197022, Russia; fosfatik@mail.ru

Received: 30.09.2024 **Accepted:** 22.10.2024 **Published online:** 30.10.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.048

Белки Мх, индуцируемые интерферонами типов I и III, являются важными медиаторами врожденного иммунитета и участвуют в защите от различных РНК- и ДНК-содержащих вирусов [1]. Эти белки принадлежат к обширному семейству ферментов гидролаз (ГТФаз) и гомологичны для позвоночных [2, 3].

У человека в 21-й хромосоме кодируются две различные Мх-ГТФазы, называемые МхА и МхВ. Оба белка локализованы в цитоплазме и при иммунофлуоресцентной детекции имеют характерное зернистое окрашивание [3]. Человеческий МхА представляет собой цитоплазматический белок массой 78 кДа, тесно связанный с гладким эндоплазматическим ретикуломом [1]. МхА обладает сравнительно широким противовирусным спектром действия против различных типов вирусов, независимо от места их внутриклеточной репликации. К МхА-чувствительным вирусам относятся представители буньявирусов, ортомиксовирусов, парамиксовирусов, рабдовирусов, тогавирусов, пикорнавирусов и вируса гепатита В — ДНК-вируса с промежуточной геномной РНК [2, 4, 5]. Интересно, что некоторые вирусы ингибируются специфичным для каждого типа клеток образом. Это позволяет предположить, что неизвестные клеточные факторы могут влиять на противовирусную специфичность [6].

В дополнение к противовирусной активности, в недавно проведенных исследованиях выявлена роль МхА при различных типах рака, в частности, при раке молочной железы и карциноме предстательной железы [1]. Так, описано, что высокий уровень МхА и обилие опухолеинфильтрирующих лимфоцитов являются независимыми прогностическими факторами безрецидивной выживаемости у пациентов с трижды негативным раком молочной железы [7]. Описано также, что экспрессия МхА опухолевыми клетками чаще приводит к выживаемости без метастазов после адъювантной химиотерапии [8]. В этой связи ожидается, что искусственное повышение уровня МхА в опухолях может приводить к благоприятному исходу у онкобольных и сделать проведение химиотерапии более эффективной. Все это позволяет предположить, что МхА является крайне перспективным терапевтическим агентом.

Поскольку МхА — внутриклеточный белок, а доставка белков такого размера в клетки все еще представляет существенную проблему, для исследования биологических свойств МхА мы предложили сравнительно новый подход использования экзогенной мРНК, кодирующей человеческий белок МхА. Эта концепция активно развивалась в последнее десятилетие и достаточно успешно реализовала себя в 2020 г. при создании нового поколения мРНК-вакцин против COVID-19 производства Pfizer/BioNTech и Moderna. Значительные успехи были достигнуты в области регенеративной медицины, где мРНК используют для перепрограммирования соматических клеток, а также в заместительной белковой терапии при лечении генетических заболеваний.

Цель исследования — сконструировать и получить методом IVT экзогенную мРНК, кодирующую функциональный цитоплазматический белок МхА человека; изучить ее трансляционные свойства; оценить и выявить закономерности в экспрессии некоторых генов системы интерферонов (ИФН-стимулируемых генов) в ответ на введение экзогенной мРНК в клетки. В дальнейшем мы предполагаем оценить терапевтический потенциал разработанных конструкций мРНК в отношении вирусов гриппа А и В, респираторно-синцитиального вируса и коронавируса SARS-CoV-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование плазмидных векторов

Нуклеотидные вставки, кодирующие человеческий белок МхА, были получены из препаратов тотальной РНК, выделенных из клеток A549, методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров (GAGAGCGGCCGCGCCACCATTGGTTGTTT/ ATCTTCTAGATTAACCGGGGAAGCTGGCAAGC), содержащих сайты рестрикции для эндонуклеаз Not I и Xba I. Фрагменты требуемой длины (2017 п.н.) были вставлены в векторную систему pJET1.2, содержащую T7-промоторную область, методом рестрикции по сайтам Not I/Xba I с последующим лигированием по липким концам. Для получения конструкции с кэп-независимой трансляцией аналогичным образом был амплифицирован IRES-фрагмент размером 605 п.н. с использованием плазмидного вектора pIRESneo3 в качестве матрицы; последовательности поли(A), 5'- и 3'-UTR длинами 114, 57 и 110 п.н. соответственно, были синтезированы компанией «Евроген» (Россия). Все нетранслируемые компоненты кассеты были лигированы в вектор pJET1.2 согласно предложенному дизайну (см. «Результаты исследования»).

Полученные в результате клонирования колонии скринировали методом ОТ-ПЦР. Плазмидные конструкции, содержащие вставки ожидаемой длины, были накоплены и очищены с использованием набора Plasmid Miniprep 2.0 («Евроген»; Россия). Последовательности разработанных плазмидных конструкций были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру компанией «Евроген» (Россия).

In vitro транскрипция

Препараты экзогенных мРНК (мРНК-МхА-CDS, мРНК-МхА-IRES, мРНК-МхА-UTR и мРНК-GFP-CDS) были получены путем IVT с использованием набора HighYield T7 ARCA mRNA Synthesis Kit (#RNT-102; Jena Bioscience, Германия). В качестве матрицы для синтеза РНК использовали 1 мкг линейаризованной по сайту Xba I плазмиды. В качестве кэпа использовали синтетический аналог ARCA, Anti-Reverse Cap Analog, добавляемый в реакционную смесь в соотношении ARCA/GTP как 4 : 1. В реакции использовали модифицированные азотистые основания 5-метилцитидин (#NU-1138, 5-Methyl-CTP, m5C; Jena Bioscience, Германия) и псевдоуридин (#NU-1139, Pseudo-UTP, Ψ; Jena Bioscience, Германия). Реакцию проводили согласно протоколу производителя.

После синтеза РНК матрицу ДНК удаляли путем последующего расщепления ДНКазой Turbo (#AM1345, Thermo Fisher Scientific; США). Для нематричного полиаденилирования 3'-концов транскрибируемых мРНК использовали набор Poly(A) Tailing Enzyme Testkit (#RNT-004, Jena Bioscience; Германия). Полученные транскрипты очищали на колонках RNA Clean & Concentrator kit (#R1017, Zymo Research; США). Концентрацию полученных мРНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop-1000 и флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific; США).

Электрофорез в агарозном геле

Препараты плазмидной ДНК анализировали в 0,8%-м агарозном геле, приготовленном на 1× TAE-буфере с содержанием бромистого этидия до 0,5 мкг/мл, с использованием 6× буфера для нанесения ДНК.

Образцы мРНК анализировали в денатурирующих условиях в 1%-м агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. 500 нг образца мРНК смешивали с равным объемом Gel Loading Buffer II (#AM1344, Invitrogen; США), прогревали в течение 5 мин при 80 °С и наносили на гель.

Результаты электрофоретического разделения визуализировали с использованием Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad; США).

Ведение клеточных культур и их трансфекция экзогенными мРНК

В работе для различных экспериментов были использованы: перевиваемая культура клеток A549 (#CCL-185, карцинома легкого человека), полученная из коллекции ATCC (США), и культура клеток MDCK (#FR-58, клетки почки собаки), полученная из коллекции IRR (США).

Клетки A549 культивировали на питательной среде F12K (Gibco; США) в присутствии 10% сыворотки КРС (Gibco; США); MDCK — на среде альфа-MEM («Биолот»; Россия) с добавлением сыворотки КРС до 5%. Ведение культур и все эксперименты проводили без добавления антибиотиков.

Для трансфекции экзогенными мРНК использовали точный 90–100% монослой клеток, ростовую среду непосредственно перед внесением мРНК заменяли на бессывороточную. Трансфекцию клеток проводили с использованием коммерческого трансфекционного реагента Lipofectamine MessengerMAX (Thermo Fisher Scientific; США) согласно инструкции производителя. В лунки 96-луночного планшета мРНК-комплексы вносили в объеме 10 мкл, в лунки 12-луночного планшета — в объеме 50 мкл. На 1 лунку 96-луночного планшета приходилось 100 нг мРНК и 0,3 мкл реагента Lipofectamine MessengerMAX, 12-луночного планшета — 450 нг РНК и 1 мкл реагента Lipofectamine MessengerMAX. В зависимости от задач эксперимента инкубацию клеток с комплексами РНК/липофектамин проводили в течение 4–24 ч при 37 °С и 5% CO₂.

Конфокальная микроскопия

Конфокальную визуализацию фиксированных клеток проводили через 24 ч после их трансфекции экзогенными мРНК. Для этого монослой клеток, выращенных на стеклянных предметных стеклах, промывали DPBS, фиксировали 4%-м раствором параформальдегида в течение 10 мин и пермеабелизовали 0,1%-м раствором Triton X-100. Блокирование осуществляли раствором 1%-го БСА на DPBS. Окраску ядер проводили DAPI (AppliChem; США), актинового цитоскелета — фаллоидином, ковалентно связанным с родамином (Thermo Fisher Scientific; США). Для визуализации белка MxA человека использовали первичные антитела MxA/Mx1 Antibody, меченые биотином (Novus Biologicals; Германия) с последующей проявкой с использованием Streptavidin DyLight 633 (Thermo Fisher Scientific; США). Микроскопию клеток проводили с помощью инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SP8 (Leica; Германия).

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Измерение уровня белка MxA проводили с использованием набора Human MxA Protein ELISA (BioVendor; Чехия) в

соответствии с инструкцией производителя. Регистрацию результатов проводили в двухволновом режиме (при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 655 нм) с использованием микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG Labtech; Германия).

Оценка уровня экспрессии

Оценку уровня экспрессии ИФН-стимулируемых генов проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, разработанных ранее [9]. Препараты тотальной РНК выделяли с использованием реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific; США), далее проводили обработку ДНКазой («Биолабмикс»; Россия). Реакцию ОТ проводили с использованием набора RNAscribe RT («Биолабмикс»; Россия) с использованием олиго(dT)₁₆-праймеров и 2 мкг РНК, свободной от примесей геномной ДНК. ПЦР проводили с использованием готового набора БиоМастер HS-qPCR (2x) («Биолабмикс»; Россия), куда вносили 1–2 мкл кДНК.

Относительную экспрессию генов рассчитывали по методу дельта-дельта Ct ($\Delta\Delta Ct$), используя GAPDH и ACTB в качестве нормировочных генов. Относительный уровень экспрессии генов определяли по индуктивной формуле $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Вычисления осуществляли с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2003/2007 (США).

Статистическая обработка результатов

Оценку статистической достоверности различий проводили при помощи компьютерной программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software; США) с использованием теста непараметрического критерия Краскела–Уоллиса (для оценки значимости различий в трех и более независимых группах) и теста Даннета (для множественного группового сравнения). Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение функциональных мРНК

Согласно базе данных NCBI [10], у человека выявлено четыре транскрипционных варианта мРНК, кодирующих белок MxA. Несмотря на разницу в длинах и вариации в 5'-UTR, транскрипционные варианты 1, 2 и 3 кодируют одинаковую изоформу белка MxA, называемую изоформой а. Транскрипционный вариант 4 имеет альтернативный 5'-UTR, а также не содержит трех экзонов в 3'-кодирующей области, что приводит к сдвигу рамки считывания, вследствие чего эта мРНК кодирует более короткую изоформу белка MxA — b, также известную как varMxA [11]. При дизайне конструкций, кодирующих мРНК гена MxA человека, были подобраны праймеры для специфического клонирования канонической формы белка MxA а.

С использованием подобранных праймеров методом ОТ-ПЦР (Pfu ДНК-полимераза) из препаратов тотальной РНК (после обработки ДНКазой) была получена последовательность, кодирующая человеческий белок MxA. Согласно результатам секвенирования (рис. 1А) последовательность была полностью идентична ожидаемой канонической изоформе белка MxA а, однако имела одну описанную аминокислотную вариацию V379I, не влияющую на физико-химические свойства белка MxA [12].

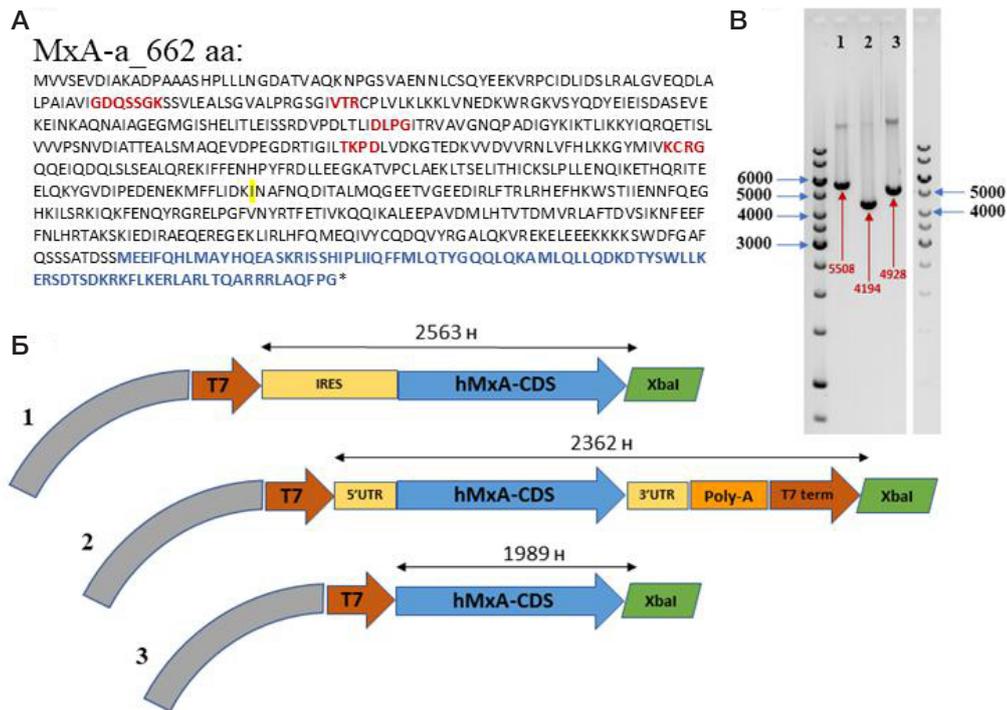


Рис. 1. Структура конструкций на основе плазмид, кодирующих экзогенную мРНК MxA человека. **А.** Аминокислотная последовательность кодируемого белка MxA (получена в результате секвенирования разработанных конструкций), красным цветом показаны G1–G5 мотивы (по порядку встречаемости), синим — С-концевой эффекторный домен ГТФазы, желтым — вариация V379I. **Б.** Схема линейаризованных плазмид, разработанных для получения мРНК методом IVT. На схемах кирпичным цветом показана T7-промоторная область для T7-полимеразы (и T7-терминаторная область в случае конструкции № 2), желтым — вспомогательные регуляторные некодирующие элементы, оранжевым (в случае № 2) — участок, обеспечивающий матричное присоединение поли(А)-хвоста (114 н.), синим — последовательность, кодирующая MxA, зеленым — сайт рестрикции, используемый для линейаризации. **В.** Электрофоретическое разделение линейаризованных плазмид, красным показаны ожидаемые длины продуктов (п.н.)

Для получения мРНК методом IVT были предложены три плазмидных конструкции (рис. 1Б), содержащие в качестве обязательного элемента кассеты промоторную область, специфичную для РНК-полимеразы фага T7. Одна из конструкций содержала исключительно белок-кодирующую последовательность MxA (мРНК-MxA-CDS), а в две другие были дополнительно введены нетранслируемые области, потенциально усиливающие эффективность трансляции белка, кодируемого этими мРНК. Для реализации кэп-независимой трансляции была сконструирована вторая мРНК-MxA-IRES, дополненная на 5'-конце укороченным IRES-элементом II типа из вируса энцефаломиокардита EMCV, содержащим бифуркационную последовательность A7 [13, 14]. Третья мРНК-MxA-UTR содержала дополнительные нетранслируемые области на 5'- и 3'-концах, а также участок, обеспечивающий матричную достройку поли(А)-хвоста в процессе IVT.

Все три предложенные плазмидные конструкции были успешно получены, накоплены, а секвенирование экспрессионных кассет показало их полное соответствие ожидаемым последовательностям. Далее плазмиды были линейаризованы (результаты электрофоретического разделения представлены на рис. 1В) и использованы в качестве матрицы ДНК для проведения IVT.

Полученные нами мРНК (рис. 2А) содержали синтетический аналог кэпа — ARCA, модифицированные основания псевдоуридин (Ψ) и 5-метилцитидин (m5C), что, согласно современным литературным данным, снижает иммуногенность экзогенных транскриптов [15, 16], а также поли(А)-хвост на 3'-конце. Последний был добавлен матрично (в случае использования кассеты для мРНК-MxA-UTR) или с проведением отдельной реакции полиаденилирования (для мРНК-CDS и мРНК-IRES).

Дополнительно нами также была получена экзогенная мРНК, кодирующая флуоресцентный зеленый белок (GFP), — мРНК-GFP-CDS, не содержащая никаких нетранслируемых областей, строение которой было эквивалентно мРНК-MxA-CDS. Количества полученных мРНК, кодирующих белок MxA, достигали 200 мкг, концентрации — до 350 нг/мл.

Оценка трансляции белкового продукта, кодируемого экзогенными мРНК

Трансляционная активность полученных экзогенных мРНК была оценена трансфекцией клеток MDCK. Методом ИФА, согласно полученным в серии экспериментов результатам, было показано, что мРНК-MxA-IRES не была способна к трансляции в исследуемой клеточной линии: выявить белок MxA при использовании этой мРНК не удалось на протяжении 36 ч после ее введения в клетки. Однако уже через 4 ч после трансфекции клеток MDCK двумя другими мРНК в клеточных лизатах на диагностически значимом уровне выявлялся белок MxA человека (результаты не представлены).

Через 20 ч после трансфекции концентрации человеческого белка MxA как в случае мРНК-MxA-CDS, так и мРНК-MxA-UTR, были сопоставимы и достигали 20 нг/мл (рис. 2Б).

Интернализация и внутриклеточная локализация человеческого белка MxA, кодируемого экзогенными мРНК, были изучены методом конфокальной микроскопии. Как показано на рис. 3, белок MxA эффективно транслировался клетками MDCK через 24 ч после введения мРНК. Как следует из результатов иммунофлуоресцентного анализа, MxA, кодируемый обеими экзогенными мРНК, присутствовал исключительно в цитоплазме клеток, располагаясь диффузно в виде характерных гранул.

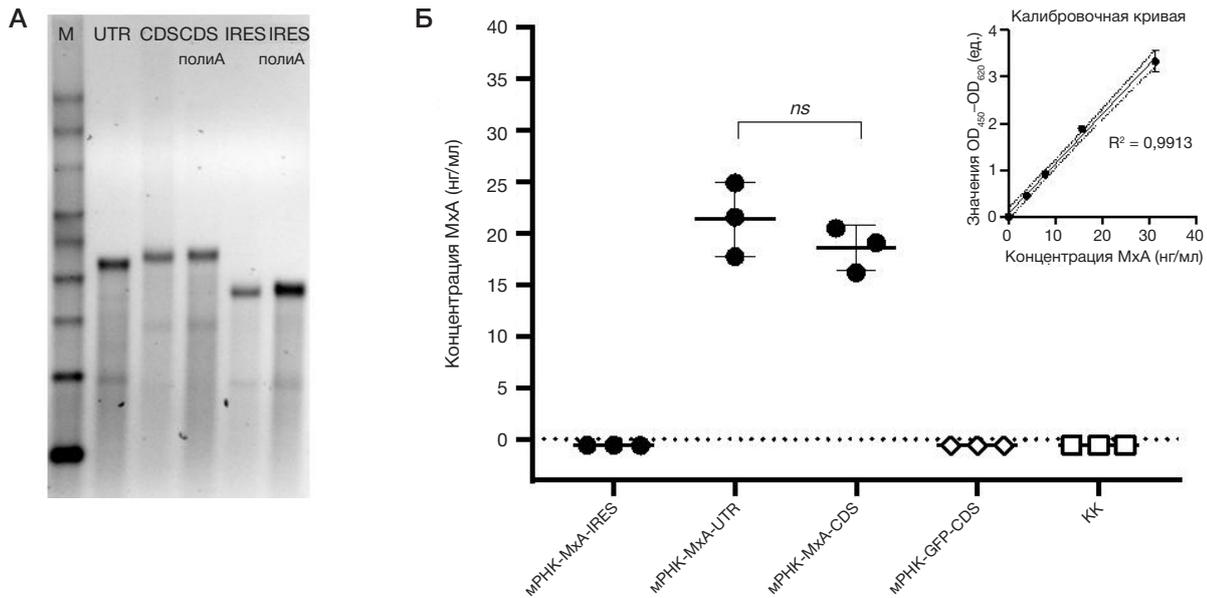


Рис. 2. Экзогенные мРНК, кодирующие белок МхА человека, и их трансляция в клетках MDCK. **А.** Электрофоретическое разделение полученных экзогенных продуктов мРНК до и после полиаденилирования, М — маркер молекулярного веса РНК (#AM1750, Thermo Fisher Scientific; США), UTR — мРНК-MxA-UTR (сразу с поли(А)-хвостом), CDS и CDS-полиА — мРНК-MxA-CDS до и после полиаденилирования, IRES и IRES-полиА — мРНК-MxA-IRES до и после полиаденилирования. **Б.** Результаты ИФА в клетках MDCK через 24 ч после трансфекции их экзогенными мРНК

Изучение экспрессии ИФН-стимулируемых генов в ответ на введение экзогенной мРНК-MxA-UTR

Известно, что введение синтетических экзогенных мРНК может приводить к активации цитозольных РНК-сенсоров и активировать иммунный ответ. Белок МхА как один из важнейших эффекторных метаболитов врожденной

иммунной системы также может модулировать продукцию ИФН-стимулируемых генов. Мы оценили специфичность этого ответа через 4 и 24 ч после трансфекции клеток A549 мРНК-MxA-UTR, используя мРНК-GFP-CDS в качестве контроля неспецифической стимуляции (рис. 4). Так, через 4 и 24 ч после трансфекции клеток мРНК-MxA-UTR детектируемый относительный уровень мРНК

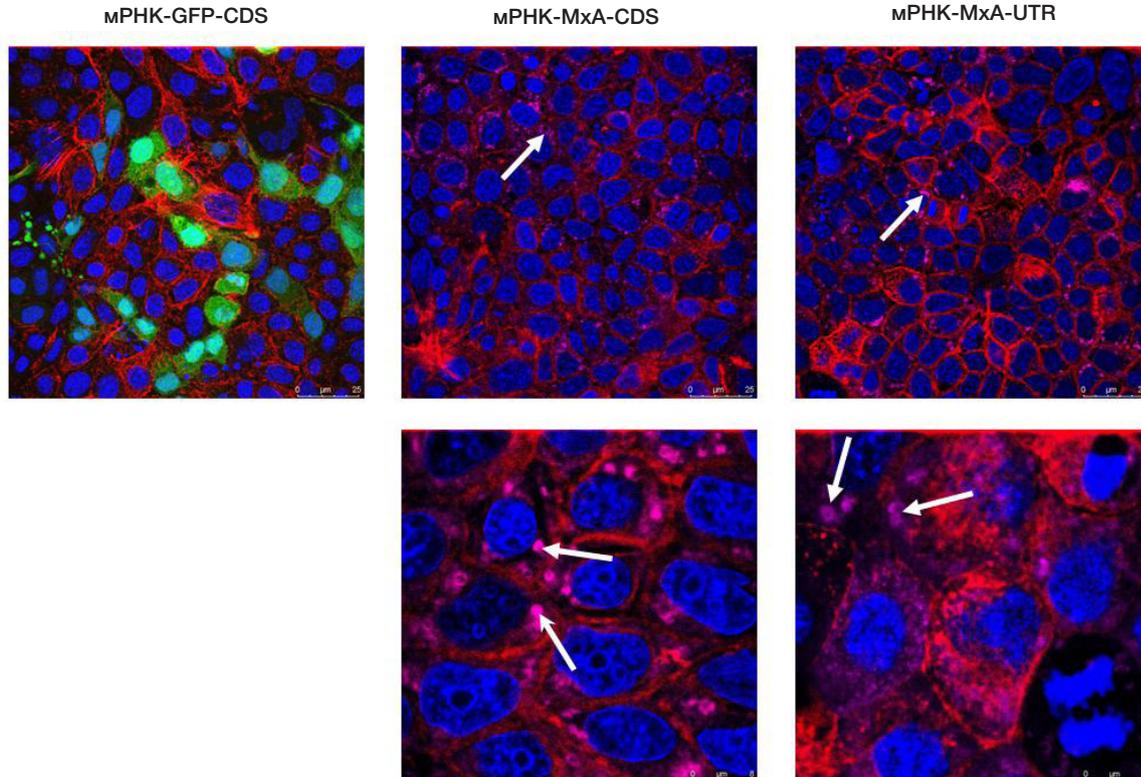


Рис. 3. Подтверждение продукции МхА в клетках MDCK методом конфокальной микроскопии. Репрезентативные фотографии клеток MDCK (фиксированные препараты) получены через 24 ч после трансфекции их экзогенными мРНК, кодирующими зеленый флуоресцентный белок (мРНК-GFP-CDS) и белок МхА человека (мРНК-MxA-CDS и мРНК-MxA-UTR), которые представлены слева направо. Синим показаны ядра клеток (DAPI, экстинкция/эмиссия: 358 (УФ)/461 нм), красным — актиновый цитоскелет (фаллоидин: 540/605 нм). МхА показан цветом маджента (620/655 нм); GFP (контрольные клетки, не трансфицированные мРНК, кодирующей МхА) показан зеленым цветом (488/509 нм). Белые стрелки направлены на характерные структуры, определяемые как белок МхА

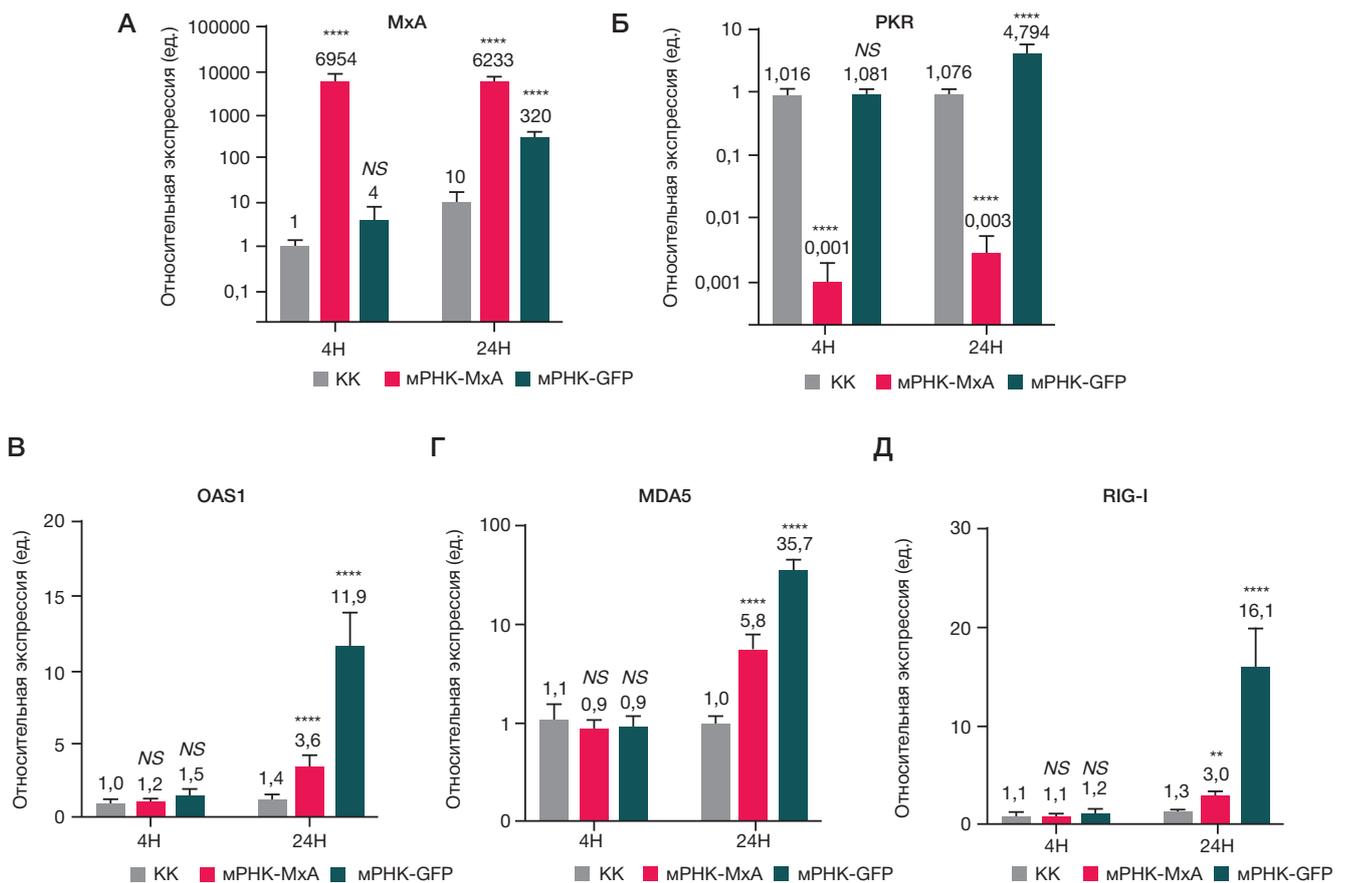


Рис. 4. Экспрессия генов MxA, PKR, OAS1, а также MDA5 и RIG-I в клетках A549 через 4 и 24 ч после трансфекции их мПНК в сравнении с интактными клетками (КК). В виде столбцов представлены средние значения (подписаны сверху) экспрессии четырех биологических повторов и стандартная ошибка среднего в качестве погрешности. Для расчета статистической достоверности выявленных различий использовали одношаговый анализ ANOVA с тестом Холма-Шидака для попарного сравнения образцов. *Звездочками* отмечены достоверные различия, выявленные при сравнении соответствующей группы с КК в этой же временной точке: ns — $P_{\text{value}} < 0,1234$; ** — $P_{\text{value}} < 0,0021$; **** — $P_{\text{value}} < 0,0001$

MxA примерно в 6500 раз превышал его уровень в контрольных клетках (принятый за единицу) (рис. 4А). Было также показано, что введение экзогенной мПНК в клетки приводит к неспецифическому (не зависящему от вида экзогенной мПНК) увеличению экспрессии гена OAS1, а также генов цитозольных сенсоров MDA5 и RIG-I, что указывает на активацию врожденного иммунного ответа. Любопытно, что трансфекция клеток мПНК-MxA-UTR приводила почти к 1000-кратному снижению уровня PKR по сравнению с интактными клетками, тогда как в случае мПНК-GFP-CDS, напротив, наблюдалась тенденция к четырехкратной активации этого гена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Белок-кодирующие экзогенные мПНК представляют собой многообещающий инструмент, как позволяющий проводить фундаментальные исследования, выявляющие закономерности функционирования, сигналинга и метаболизма белков в клетках, так и имеющий огромный терапевтический потенциал. Сконструированные и синтезированные нами препараты экзогенных мПНК, кодирующие белок MxA человека, в дальнейшем будут использоваться для оценки их противовирусного действия в отношении респираторных вирусов.

Синтетические мПНК обладают той же структурой, что и природные молекулы мПНК: имеют кэп на 5'-конце (чаще его структурный аналог), 5'- и 3'-UTR, фланкирующие белок-кодирующую область, и поли(A)-хвост [17, 18].

Из трех предложенных мПНК нам удалось достоверно показать стабильную трансляцию двух конструкций, одна из которых содержала участки 5'- и 3'-UTR, другая, кроме белок-кодирующей части, не содержала никаких служебных областей (за исключением аналога кэпа и поли(A)-хвоста). Удивительно, но несмотря на показанную в литературе повышенную эффективность трансляции IRES-содержащих мПНК [19], синтез белка с предложенной нами мПНК-MxA-IRES не происходил. В нашей работе мы использовали IRES-элемент EMCV семейства пикорнавирусов, не задействующих кэп в процессе репликации. Полученная конструкция мПНК содержала одновременно и кэп-аналог, и IRES-элемент. Предположительно, одновременное наличие в непосредственной близости этих двух рибосом-узнаваемых участков приводит к блокированию кэп-зависимой трансляции с этого транскрипта.

Тем не менее в дальнейшем мы планируем оценить трансляцию синтетической мПНК-MxA-IRES, не содержащей кэп-аналога. По литературным данным, несмотря на то что в нормальных условиях IRES-зависимая трансляция имеет более низкую эффективность по сравнению с кэп-зависимой, в условиях клеточного стресса (в том числе теплового шока, вирусного инфицирования и т. д.) IRES-опосредованная трансляция может сохраняться и превосходить трансляцию с использованием кэпа [20].

Известно, что одними из ключевых регуляторов внутриклеточной кинетики молекулы мПНК являются 5'- и 3'-UTR. В частности, мПНК с длинными 3'-UTR имеют более короткий период полураспада, в то время как мПНК

с короткими 3'-UTR транслируются менее эффективно [18]. Сопоставление уровней белка MxA в клетках MDCK через 24 ч после трансфекции их экзогенными мРНК не позволило выявить какие-либо преимущества в трансляционной активности, обусловленные наличием или отсутствием в них участков UTR. Обе мРНК, способные к трансляции, приводили к продукции белка на уровне 20 нг/мл через сутки после трансфекции. Иммунофлуоресцентный анализ клеток MDCK, трансфицированных экзогенными мРНК, показал наличие в них гранул предположительно кольцевой конфигурации (выявляется при максимальном увеличении), диффузно распределенных в цитозоле. Этот результат полностью согласуется с опубликованными данными о том, что *in vivo* при физиологических концентрациях солей в клетке происходит гомоолигомеризация MxA; такая агрегация предотвращает деградацию и обеспечивает стабильность белка с периодом полураспада более 24 ч [21]. Наши результаты позволяют предположить, что продуцируемый белок MxA будет функционировать в клетках подобно нативному.

При оценке противовирусного потенциала белка MxA, транслируемого с экзогенной мРНК, особое внимание следует уделить неспецифической активации врожденного иммунного ответа, обусловленной повышенной иммуногенностью молекулы мРНК. Известно, что паттерн-распознающие рецепторы, такие как трансмембранные TLR3, 7, 8, 9, а также цитозольные сенсоры RIG-I и MDA5, способны узнавать чужеродные нуклеиновые кислоты и приводить к ответной экспрессии провоспалительных цитокинов или активации воспаления [22]. Нами было показано повышение экспрессии цитозольных сенсоров RIG-I и MDA5, а также ИФН-стимулируемого гена OAS1, через 24 ч после трансфекции клеток экзогенными мРНК. Паттерны экспрессии этих генов отличались по силе и коррелировали друг с другом для разных экзогенных мРНК. Мы предполагаем, что эти изменения обусловлены

неспецифической иммуногенностью экзогенных мРНК. Наибольшее воздействие на экспрессию исследованных генов оказала мРНК, кодирующая GFP, что может быть связано как с ее структурой, так и с тем, что в случае мРНК-MxA возможна негативная регуляция экспрессии этих генов, обусловленная петлей отрицательной обратной связи.

Любопытно, что трансфекция клеток A549 мРНК-MxA-UTR уже через 4 ч приводила к продолжительной (как минимум до 24 ч) мощной специфической супрессии ПКР на уровне транскрипции.

Выводы

В представленной работе: 1) с использованием разработанных нами плазмидных конструкций в качестве матрицы в реакциях IVT были получены мРНК, кодирующие белок MxA, способные к эффективной трансляции в эукариотических системах; 2) уровни накопления белкового продукта MxA после трансфекции клеток экзогенными мРНК достигали 20 нг/мл в течение суток; 3) подтверждено диффузное внутриклеточное распределение белка MxA в клетках; 4) исследована экспрессия цитозольных сенсоров и некоторых ИФН-стимулируемых генов в ответ на введение в клетки экзогенной мРНК, кодирующей белок MxA человека. Дальнейшие исследования авторов будут посвящены оценке терапевтического потенциала разработанных конструкций мРНК в отношении вирусов гриппа подтипов А и В, респираторно-синцитиального вируса и коронавируса SARS-CoV-2. Первоначально изучение будет проведено на клеточных моделях инфекций, вызываемых перечисленными патогенами, а при высоком терапевтическом потенциале планируется оценить противовирусное действие экзогенных мРНК, кодирующих белок MxA, на мышинной модели гриппозной пневмонии.

Литература

- Liao S, Gao S. MxA: a broadly acting effector of interferon-induced human innate immunity. *Visualized Cancer Medicine*. 2022; 3: 2. Available from: <https://doi.org/10.1051/vcm/2022002>.
- Verhelst J, Hulpiau P, Saelens X. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2013; 77 (4): 551–66. Available from: <https://doi.org/10.1128/mmmbr.00024-13>.
- Haller O, Kochs G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*. 2002; 3 (10): 710–7. Available from: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.31003.x>.
- Zürcher T, Pavlovic J, Staeheli P. Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *The EMBO Journal*. 1992; 11 (4): 1657–61. Available from: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05212.x>.
- Johannes L, et al. Antiviral determinants of rat Mx GTPases map to the carboxy-terminal half. *Journal of virology*. 1997; 71 (12): 9792–5. Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9792-9795.1997>.
- Jung HE, Oh JE, Lee HK. Cell-penetrating Mx1 enhances anti-viral resistance against mucosal influenza viral infection. *Viruses*. 2019; 11 (2): 109. Available from: <https://doi.org/10.3390/v11020109>.
- Sistigu A, et al. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nature medicine*. 2014; 20 (11): 1301–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm.3708>.
- Kim YA, et al. MxA expression is associated with tumor-infiltrating lymphocytes and is a prognostic factor in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2016; 156: 597–606. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3786-z>.
- Klotchenko SA, et al. Comparative analysis of MxA, OAS1, PKR gene expression levels in leukocytes of patients with influenza and coronavirus infection. *Medical academic journal*. 2023; 23 (3): 65–75. Available from: <https://doi.org/10.17816/MAJ623374>.
- База данных NCBI, доступно по ссылке: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.
- Noguchi S, et al. MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. *Immunogenetics*. 2013; 65: 107–14. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00251-012-0663-8>.
- Tazi-Ahnini R, et al. Structure and polymorphism of the human gene for the interferon-induced p78 protein (MX1): evidence of association with alopecia areata in the Down syndrome region. *Human genetics*. 2000; 106: 639–45. Available from: <https://doi.org/10.1007/s004390000318>.
- Elroy-Stein O, Fuerst TR, Moss B. Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989; 86 (16): 6126–30. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6126>.
- Bochkov YA, Palmenberg AC. Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *Biotechniques*. 2006; 41 (3): 283–92. Available from: <https://doi.org/10.2144/000112243>.

15. Kariko K, Weissman D. Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 2007; 10 (5): 523. PMID: 17786850.
16. Karikó K, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Molecular therapy*. 2008; 16 11: 1833–40. Available from: <https://doi.org/10.1038/mt.2008.200>.
17. Weissman D. mRNA transcript therapy. Expert review of vaccines. 2015; 14 (2): 265–81. Available from: <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.973859>.
18. von Niessen AGO, et al. Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Molecular Therapy*. 2019; 27 (4): 824–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.12.011>.
19. Xue S, et al. RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature*. 2015; 517 (7532): 33–38. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature14010>.
20. Koch A, et al. Quantifying the dynamics of IRES and cap translation with single-molecule resolution in live cells. *Nature structural & molecular biology*. 2020; 27 (12): 1095–104. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0504-7>.
21. Haller O, Kochs G. Mx genes: host determinants controlling influenza virus infection and trans-species transmission. *Human genetics*. 2020; 139 (6): 695–705. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02092-8>.
22. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010; 11 (5): 373–84. Available from: <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.

References

1. Liao S, Gao S. MxA: a broadly acting effector of interferon-induced human innate immunity. *Visualized Cancer Medicine*. 2022; 3: 2. Available from: <https://doi.org/10.1051/vcm/2022002>.
2. Verhelst J, Hulpiac P, Saelens X. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2013; 77 (4): 551–66. Available from: <https://doi.org/10.1128/mmr.00024-13>.
3. Haller O, Kochs G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*. 2002; 3 (10): 710–7. Available from: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.31003.x>.
4. Zürcher T, Pavlovic J, Staeheli P. Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *The EMBO Journal*. 1992; 11 (4): 1657–61. Available from: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05212.x>.
5. Johannes L, et al. Antiviral determinants of rat Mx GTPases map to the carboxy-terminal half. *Journal of virology*. 1997; 71 (12): 9792–5. Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9792-9795.1997>.
6. Jung HE, Oh JE, Lee HK. Cell-penetrating Mx1 enhances anti-viral resistance against mucosal influenza viral infection. *Viruses*. 2019; 11 (2): 109. Available from: <https://doi.org/10.3390/v11020109>.
7. Sistigu A, et al. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nature medicine*. 2014; 20 (11): 1301–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm.3708>.
8. Kim YA, et al. MxA expression is associated with tumor-infiltrating lymphocytes and is a prognostic factor in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2016; 156: 597–606. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3786-z>.
9. Klotchenko SA, et al. Comparative analysis of MxA, OAS1, PKR gene expression levels in leukocytes of patients with influenza and coronavirus infection. *Medical academic journal*. 2023; 23 (3): 65–75. Available from: <https://doi.org/10.17816/MAJ623374>.
10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>.
11. Noguchi S, et al. MxA transcripts with distinct first exons and modulation of gene expression levels by single-nucleotide polymorphisms in human bronchial epithelial cells. *Immunogenetics*. 2013; 65: 107–14. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00251-012-0663-8>.
12. Tazi-Ahnini R, et al. Structure and polymorphism of the human gene for the interferon-induced p78 protein (MX1): evidence of association with alopecia areata in the Down syndrome region. *Human genetics*. 2000; 106: 639–45. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00439000318>.
13. Elroy-Stein O, Fuerst TR, Moss B. Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989; 86 16: 6126–30. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6126>.
14. Bochkov YA, Palmenberg AC. Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *Biotechniques*. 2006; 41 (3): 283–92. Available from: <https://doi.org/10.2144/000112243>.
15. Kariko K, Weissman D. Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 2007; 10 (5): 523. PMID: 17786850.
16. Karikó K, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Molecular therapy*. 2008; 16 11: 1833–40. Available from: <https://doi.org/10.1038/mt.2008.200>.
17. Weissman D. mRNA transcript therapy. Expert review of vaccines. 2015; 14 (2): 265–81. Available from: <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.973859>.
18. von Niessen AGO, et al. Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Molecular Therapy*. 2019; 27 (4): 824–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.12.011>.
19. Xue S, et al. RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature*. 2015; 517 (7532): 33–38. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature14010>.
20. Koch A, et al. Quantifying the dynamics of IRES and cap translation with single-molecule resolution in live cells. *Nature structural & molecular biology*. 2020; 27 (12): 1095–104. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0504-7>.
21. Haller O, Kochs G. Mx genes: host determinants controlling influenza virus infection and trans-species transmission. *Human genetics*. 2020; 139 (6): 695–705. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02092-8>.
22. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010; 11 (5): 373–84. Available from: <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.

ИЗМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ФИТНЕСА В ХОДЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АДАПТАЦИИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* К КОЛИСТИНУ

Н. А. Маянский, Е. А. Бржозовская [✉], Г. А. Скворцов-Игралов, С. В. Чаусова, И. В. Чеботарь

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова

Опportunистический патоген *Pseudomonas aeruginosa* занимает одно из ведущих мест в структуре возбудителей нозокомиальных инфекций, что связано с высоким адаптивным потенциалом и способностью быстро формировать устойчивость к антимикробным препаратам. Целью работы было оценить влияние адаптации *P. aeruginosa* к колистину на бактериальный фитнес. В исследование включили 9 изолятов, полученных в ходе экспериментальной эволюции штамма *P. aeruginosa* (лабораторный номер 1202) в условиях возрастающей концентрации колистина, кинетику роста которых сравнивали с родительским штаммом; у всех изолятов провели полногеномное секвенирование и определили минимальную подавляющую концентрацию колистина. Темпы роста оценивали при помощи многофункционального ридера Varioskan LUX (Thermo Scientific, США) в течение 18 ч при 37 °С, каждые 15 мин измеряя оптическую плотность (ОП) при $\lambda = 600$ нм. Учитывали максимальную скорость роста (CP_{max} , т. е. максимальное изменение ОП в течение 1 ч) и время, необходимое для достижения 50% от максимальной ОП, зарегистрированной при росте родительского штамма *Pa_1202_0* ($T_{OP50\%}$). Изоляты клона с мутациями в генах *phoQ*, *lptA* и *prs* отличались низкими показателями фитнеса от родительских штаммов. Например, CP_{max} изолята *Pa_1202_43* составила 0,029 ОП/ч против 0,182 ОП/ч у исходного изолята *Pa_1202_0*, а $OP_{50\%}$ он достигал на 4,6 ч позже. Роствые характеристики клона с мутациями в *lpxL* и *lptB*, а также клона, несущего мутированный *pmrB*, в целом были сопоставимы с показателями родительского штамма. Таким образом, модификации генома, наблюдавшиеся в ходе адаптации *P. aeruginosa* к колистину, оказывают неоднозначное влияние на бактериальный фитнес.

Ключевые слова: синегнойная палочка, нозокомиальные инфекции, бактериальный фитнес, колистин, гены резистентности

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

Вклад авторов: Н. А. Маянский — концептуализация, анализ данных, редактирование рукописи; Е. А. Бржозовская — методология, подготовка и написание рукописи; Г. А. Скворцов-Игралов — формальный анализ экспериментальных данных; С. В. Чаусова — валидация данных; И. В. Чеботарь — методология, концептуализация, валидация данных.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Анатольевна Бржозовская
Ленинский проспект, д. 117/1, г. Москва, 119571; emmbf@yandex.ru

Статья получена: 22.08.2024 **Статья принята к печати:** 29.09.2024 **Опубликована онлайн:** 19.10.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.042

CHANGES IN BACTERIAL FITNESS DURING THE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EXPERIMENTAL ADAPTATION TO COLISTIN

Mayanskiy NA, Brzhozovskaya EA [✉], Skvortsov-Igralov GA, Chausova SV, Chebotar IV

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Pseudomonas aeruginosa, the opportunistic pathogen, occupies one of the leading places in the structure of pathogens causing nosocomial infections, which is due to high adaptive potential and the ability to quickly develop antimicrobial resistance. The study aimed to assess the influence of the *P. aeruginosa* adaptation to colistin on bacterial fitness. A total of nine isolates obtained during the experimental evolution of the *P. aeruginosa* strain (laboratory number 1202) under conditions of increasing colistin concentrations, the growth kinetics of which was compared to that of wild type strain, were included in the study; the whole genome sequencing of all isolates was performed, and the minimum inhibitory concentration of colistin was determined. Growth rate was estimated using the Varioskan LUX multimodal reader (Thermo Scientific, USA) throughout 18 h at 37 °C; optical density (OD) at $\lambda = 600$ nm was measured every 15 min. The maximum growth rate (GR_{max} , i.e. the maximum change in OD within 1h) and the time to reach 50% of the maximum OD reported when growing the wild type *Pa_1202_0* strain ($T_{OD50\%}$) were considered. Isolates of the clone carrying mutations of the genes *phoQ*, *lptA*, and *prs* showed low fitness values compared to wild type strains. For example, GR_{max} of the isolate *Pa_1202_43* was 0.029 OD/h vs. 0.182 OD/h reported for the original isolate *Pa_1202_0*, and it reached $OD_{50\%}$ 4.6 h later. The growth characteristics of the clone carrying mutations of *lpxL* and *lptB*, as well as the clone carrying mutant *pmrB* were generally comparable with the characteristics of the wild type strain. Thus, the genome modifications observed during the *P. aeruginosa* adaptation to colistin have an ambiguous effect on bacterial fitness.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, nosocomial infections, bacterial fitness, colistin, resistance genes

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

Author contribution: Mayanskiy NA — concept, data analysis, manuscript editing; Brzhozovskaya EA — methodology, manuscript preparation and writing; Skvortsov-Igralov GA — formal analysis of experimental data; Chausova SV — data validation; Chebotar IV — methodology, concept, data validation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina A. Brzhozovskaya
Leninsky prospect, 117/1, Moscow, 119571; emmbf@yandex.ru

Received: 22.08.2024 **Accepted:** 29.09.2024 **Published online:** 19.10.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.042

Pseudomonas aeruginosa является актуальным патогеном-оппортунистом, успех в поддержании жизнедеятельности которого в клинических условиях обусловлен высоким адаптивным потенциалом. Быстрая адаптация к новым экологическим локусам, антимикробным препаратам и эффекторам иммунной системы позволяет *P. aeruginosa* оставаться одной из главных причин нозокомиальной заболеваемости [1]. Инфекции, вызванные полирезистентными штаммами *P. aeruginosa*, трудно поддаются лечению, и лишь

немногие антимикробные препараты сохраняют активность в отношении таких возбудителей. Одним из антибиотиков «последнего шанса» является полимиксиновый антибиотик колистин [2].

Расширение клинического использования колистина неизбежно приводит к появлению колистинрезистентности. Устойчивость к колистину обусловлена изменением структуры его мишени — липополисахарида (ЛПС), что снижает связывание антибиотика с клеточной стенкой

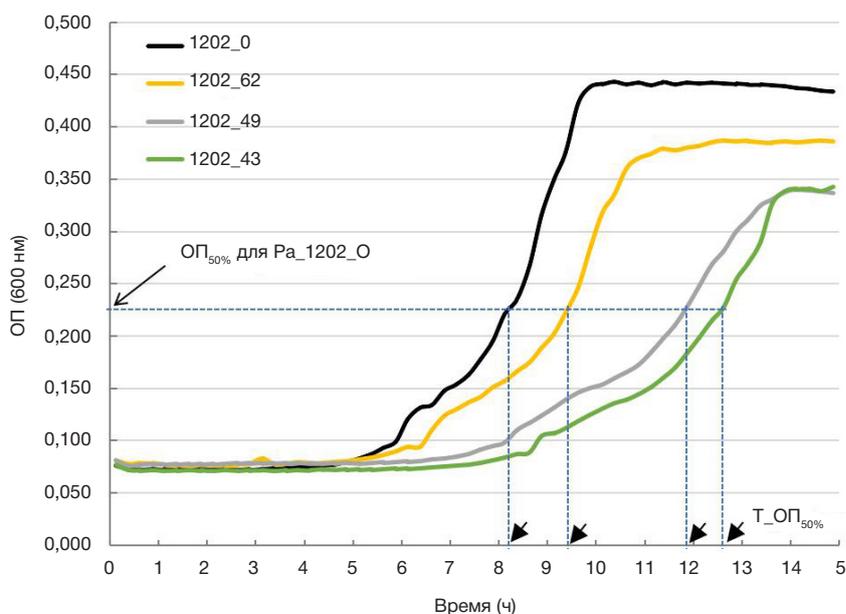


Рис. Кривые роста родительского штамма *Pa_1202_0* и его дочерних изолятов клона *Pa_phoQ/lptA/prs*. Бактерии инкубировали в 96-луночном планшете при 37 °С, каждые 15 мин измеряя оптическую плотность (ОП), $\lambda = 600$ нм. Открытая длинная стрелка указывает на значение ОП, соответствующее 50% от максимальной ОП, зарегистрированной при росте родительского штамма *Pa_1202_0* (ОП_{50%}). Закрытые короткие стрелки указывают на время достижения ОП_{50%} (Т_{ОП50%}) исследованными изолятами. Характеристики изолятов представлены в табл. Репрезентативный результат одного из трех повторов эксперимента

бактерии [3]. Модификация ЛПС и резистентность к колистину у *P. aeruginosa* обычно связаны с повреждением двухкомпонентных систем *PhoP-PhoQ* и *PmrA-PmrB* в результате мутаций соответствующих генов, хотя и не ограничивается этими механизмами [3, 4]. Мутации, формирующие устойчивость, дают преимущество их носителям при наличии антибиотика, однако эти же мутации могут снижать уровень жизнеспособности микроорганизма в целом, который в отсутствие антибиотика становится неконкурентоспособным. Компенсировать биологические затраты, связанные с резистентностью, могут мутации, которые запускают альтернативные пути метаболизма в клетке и замещают выпадающие звенья обмена веществ [5–7]. В связи с этим исследование бактериального фитнеса, т. е. уровня поддержания жизнедеятельности, который может быть выражен, в частности, в изменении темпов роста бактериальной популяции [8], служит важным дополнением к генетическому анализу механизмов резистентности.

В недавно проведенном исследовании, посвященном экспериментальной адаптации *P. aeruginosa* к колистину, мы показали, что при формировании колистинрезистентности геном эволюционировал альтернативными путями не только у разных штаммов, но и в пределах одного штамма бактерий [9]. Изоляты одного из экспериментальных штаммов *P. aeruginosa*, полученные на различных этапах адаптации к колистину и проанализированные при помощи полногеномного секвенирования, мы использовали в настоящей работе. Для исследования были отобраны изоляты с разными мутациями, у которых исследовали кинетику роста и сравнили ее с родительским штаммом. Цель работы — исследовать взаимосвязь генотипических и фенотипических характеристик в экспериментальных моделях, что подчеркивает важность исходного генетического фона в развитии устойчивости к антимикробным препаратам, позволяет вскрыть новые знания о механизмах антибиотикорезистентности и наметить новые пути преодоления лекарственной устойчивости бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали штамм *P. aeruginosa* (лабораторный номер 1202, геном депонирован в GenBank), выделенный из окружающей среды в 2016 г., чувствительный ко всем антибиотикам, и его дочерние изоляты, полученные в ходе экспериментальной адаптации к колистину, методика которой была подробно описана ранее [9].

Для оценки бактериального фитнеса сравнивали темпы роста родительского и дочерних штаммов *Pa_1202*, полученных в ходе адаптационного эксперимента. Из единичной колонии суточной культуры каждого изолята готовили бактериальную суспензию, стандартизировали ее по оптической плотности до 0,5 ед. McFarland, инокулировали 10 мкл полученной взвеси в 10 мл бульона Луриа–Бертани, после чего отбирали 200 мкл и переносили в лунку 96-луночного плоскодонного планшета. Планшет заклеивали прозрачной пленкой и инкубировали в многофункциональном ридере Varioskan LUX (Thermo Scientific, США) в течение 18 ч при 37 °С, каждые 15 мин измеряя оптическую плотность (ОП) при $\lambda = 600$ нм. Кривые роста анализировали при помощи программы SkanIt версии 7.0 (Thermo Scientific; США). Темпы роста оценивали при помощи двух следующих показателей: 1) максимальная скорость роста (СР_{max}; соответствует максимальному изменению ОП в течение 1 ч, единица измерения ОП/ч); 2) время, необходимое для достижения 50% от максимальной ОП, зарегистрированной при росте родительского штамма *Pa_1202_0* (Т_{ОП50%}) (рис.). Уменьшение СР_{max} и увеличение Т_{ОП50%} расценивали как снижение фитнеса. Эксперимент проводили в трех повторах.

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) колистина в диапазоне 0,25–16 мг/л определяли наборами ComASP Colistin 0,25-16 (Liofilchem srl., Италия), а более высокие МПК (до 64 мг/л) оценивали при помощи метода микроразведений в бульоне. Значения МПК интерпретировали, исходя из их экспериментальной динамики, но не клинической значимости.

Таблица. Фенотип и генотип изолятов, полученных в ходе экспериментальной адаптации к колистину

Изолят	День	МПК колистина (мг/л)	CP _{max} (ОП/ч)	T _{ОП_{50%}} (ч)	<i>phoQ</i>	<i>pmrB</i>	<i>lpxL</i>	<i>lptA</i>	<i>lptB</i>	<i>prs</i>	<i>speE</i>	<i>hp/PA2117</i>	<i>tetC</i>	<i>oprH</i>
			Среднее (СО)											
1202_0	0	1	0,182 (0,018)	8,8 (0,1)										
Клон <i>Pa_phoQ/lptA/prs</i>														
1202_43	11	32	0,029 (0,001) *	13,4 (0,2) *										
1202_49	13	1	0,038 (0,009) *	12,7 (0,2) *										
1202_62	16	2	0,140 (0,012)	10,0 (0,1) *										
Клон <i>Pa_phoQ/lpxL/lptB</i>														
1202_63	16	16	0,285 (0,015) *	8,9 (0,0)										
1202_80	20	2	0,268 (0,059)	9,0 (0,1)										
1202_95	28	16	0,163 (0,016) *	9,2 (0,1)										
Клон <i>Pa_pmrB</i>														
1202_37	9	1	0,155 (0,016)	8,9 (0,0)										
1202_44	11	2	0,219 (0,029)	9,0 (0,1)										
1202_88	24	16	0,198 (0,026)	7,9 (0,1) *										

Примечание: десять изолятов *Pa_1202* получили в указанные дни эксперимента [9]. Определяли минимальную подавляющую концентрацию (МПК) колистина, а также оценивали фитнес путем анализа кривых роста с измерением максимальной скорости роста (CP_{max}) и времени достижения 50% от максимальной оптической плотности (ОП), зарегистрированной при росте родительского штамма *Pa_1202_0* (T_{ОП_{50%}}) (см. рис.). Гены кор-генома исследовали при помощи полногеномного секвенирования. Зеленые ячейки соответствуют последовательности генов, идентичных *Pa_1202_0*, мутации отмечены красным цветом. Оранжевым цветом выделены названия генов, участвующих в синтезе липополисахарида и связанных с устойчивостью к колистину; неокрашены названия генов общего метаболизма, напрямую не связанных с устойчивостью к колистину. СО — стандартное отклонение. * — $p < 0,05$ по сравнению с *Pa_1202_0*.

Полногеномное секвенирование проводили с использованием бактериальной ДНК, выделенной из суточных культур экспериментальных изолятов *Pa_1202*, выращенных из замороженных образцов (см. выше) на агаре Мюллера–Хинтона. Процедура полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа подробно описана ранее [9].

Статистическую обработку проводили в программе IBM SPSS Statistics, v 27.0. (США). Количественные результаты в тексте и таблице представлены в виде среднего (стандартное отклонение). Для сравнения показателей CP_{max} и T_{ОП_{50%}} использовали тест Манна–Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Темпы роста проанализировали у родительского штамма *Pa_1202_0* и у 9 изолятов *Pa_1202*, которые представляли три основные клональные линии, полученные в ходе экспериментальной адаптации к колистину и описанные нами ранее [9] (см. таблицу). Два клона носили идентичную мутацию в *phoQ* (ins-ATCGCCT-1086), но различались по мутациям в других генах. В одном случае дополнительные повреждения были обнаружены в генах *lptA* (ins-CCGCGC-490) и *prs* (T143→C), клон назвали *Pa_phoQ/lptA/prs*. В другом случае были изменены гены *lpxL* (ins-C-335) и *lptB* (ins-GCG-27), клон назвали *Pa_phoQ/lpxL/lptB*. Третий клон характеризовался мутацией в гене *pmrB* (T92→G) (клон назвали *Pa_pmrB*) в сочетании с повреждением гена *hp/PA2117* (G326→A).

Изоляты клона *Pa_phoQ/lptA/prs* отличались низкими показателями фитнеса по сравнению с родительским штаммом *Pa_1202_0* (см. рис. и табл.). Например, CP_{max} изолята 1202_43 составила 0,029 (0,001) ОП/ч против 0,182 (0,018) ОП/ч у исходного изолята *Pa_1202_0*, а ОП_{50%} он достигал на 4,6 ч позже.

Ростовые характеристики клонов *Pa_lpxL/lptB* и *Pa_pmrB* в целом были сопоставимы с показателями родительского штамма *Pa_1202_0* (см. таблицу). У двух изолятов отмечены

значимое повышение CP_{max} (1202_63) и значимое снижение T_{ОП_{50%}} (1202_88), что указывало на лучшие темпы роста по сравнению с родительским штаммом, несмотря на 16-кратное увеличение МПК колистина (табл. 1). У изолята 1202_95 из клона *Pa_pmrB* была значимо снижена CP_{max}, однако T_{ОП_{50%}} отличалась незначимо от исходного штамма.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы показали, как экспериментальная адаптация *P. aeruginosa* к колистину влияла на бактериальный фитнес, оценив кинетику роста изолятов с различными генотипами. Различия фитнес-способностей между представителями трех изученных клонов логичнее всего объяснить, анализируя профили геномных альтераций, характерных для каждого клона. Геномы изолятов клона *Pa_phoQ/lptA/prs* включали два типа изменений: 1) мутации в генах *phoQ* и *lptA*, которые непосредственно контролируют биосинтез главной мишени полимиксинов — ЛПС [10, 11]; 2) мутации в гене рибозофосфатпирофосфокиназы *prs*, который напрямую не связан с синтезом ЛПС и контролирует синтез и метаболизм нуклеотидов. *PhoP*, компонент регуляторной системы *PhoPQ*, непосредственно участвует в регуляции синтеза ЛПС, его поломки считают частой причиной колистинрезистентности [10]. Продукт гена *lptA* обеспечивает сборку ЛПС и его транслокацию в наружную мембрану [11]. Комплексные изменения генома в клоне *Pa_phoQ/lptA/prs* сочетались с наиболее выраженным понижением бактериального фитнеса.

У клона *Pa_phoQ/lpxL/lptB* были обнаружены мутации только в генах синтеза ЛПС, включая уже упоминавшийся *phoQ*, *lpxL* (ген лауроилацилтрансферазы, осуществляющей биосинтез липида А) и *lptB* (ген транспортера *LptB2FG*, перемещающего ЛПС в наружную мембрану) [12, 13].

Клон *Pa_pmrB* сочетал мутации в генах сенсор-киназы *pmrB* и гипотетического протеина *hp/PA2117*. Киназа *PmrB* является элементом двухкомпонентной системы, которая регулирует множество функций, включая

экспрессию генов ЛПС-оперона; ранее было доказано, что повреждения гена *pmrB* снижают чувствительность *P. aeruginosa* к полимиксинам [14, 15]. Продукт гена *hp/PA2117* до настоящего времени не верифицирован.

ВЫВОДЫ

Модификации генома, наблюдавшиеся в ходе адаптации *P. aeruginosa* к колистину, оказывают неоднозначное влияние на бактериальный фитнес. Очевидно, что

наиболее тяжелые последствия для приспособленности бактерий несет сочетание мутаций в генах ЛПС-синтеза и генах общего метаболизма, как наблюдалось в клоне *Pa_phoQ/ptA/prs*. Дальнейшее изучение взаимоотношений генотипа и фенотипа при помощи экспериментального моделирования позволит улучшить понимание механизмов бактериальной адаптации к факторам внешней среды, в том числе формирования антибиотикорезистентности, и наметить новые пути преодоления лекарственной устойчивости бактерий.

Литература

1. Algammal A, Hetta HF, Mabrok M, Behzadi P. Editorial: Emerging multidrug-resistant bacterial pathogens "superbugs": A rising public health threat. *Front Microbiol.* 2023; 14: 1135614. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1135614. PMID: 36819057; PMCID: PMC9930894.
2. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms.* 2020; 8 (11): 1716. DOI: 10.3390/microorganisms8111716. PMID: 33147701; PMCID: PMC7692639.
3. Shahzad S, Willcox MDP, Rayamajhee B. A Review of Resistance to Polymyxins and Evolving Mobile Colistin Resistance Gene *mcr* among Pathogens of Clinical Significance. *Antibiotics (Basel).* 2023; 12 (11): 1597. DOI: 10.3390/antibiotics12111597. PMID: 37998799; PMCID: PMC10668746.
4. Yang B, Liu C, Pan X, Fu W, Fan Z, Jin Y, et al. Identification of Novel PhoP-PhoQ Regulated Genes That Contribute to Polymyxin B Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms.* 2021; 9 (2): 344. DOI: 10.3390/microorganisms9020344. PMID: 33572426; PMCID: PMC7916210.
5. Чеботарь И. В., Кулешов К. В. Между антибиотикорезистентностью и вирулентностью: диалектика бактериального фитнеса. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2024; 26 (1): 59-66. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2024.1.59-66>.
6. Olivares Pacheco J, Alvarez-Ortega C, Alcalde Rico M, Martínez JL. Metabolic Compensation of Fitness Costs Is a General Outcome for Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Mutants Overexpressing Efflux Pumps. *mBio.* 2017; 8 (4): e00500-17. DOI: 10.1128/mBio.00500-17. PMID: 28743808; PMCID: PMC5527304.
7. Sendra E, Fernández-Muñoz A, Zamorano L, Oliver A, Horcajada JP, Juan C, Gómez-Zorrilla S. Impact of multidrug resistance on the virulence and fitness of *Pseudomonas aeruginosa*: a microbiological and clinical perspective. *Infection.* 2024. DOI: 10.1007/s15010-024-02313-x. Epub ahead of print. PMID:38954392.
8. Шамина О. В., Крыжановская О. А., Лазарева А. В., Алябьева Н. М., Маянский Н. А. Устойчивость карбапенемрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* к колистину: молекулярные механизмы и бактериальный фитнес. *Вестник РГМУ.* 2020; 3: 11–18. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.032.
9. Chebotar I, Savinova T, Bocharova J, Korostin D, Evseev P, Mayanskiy N. Genetic Alternatives for Experimental Adaptation to Colistin in Three *Pseudomonas aeruginosa* Lineages. *Antibiotics.* 2024; 13: 452. Available from: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13050452>.
10. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (12): 5761–9. DOI: 10.1128/AAC.05391-11. Epub 2011 Oct 3. PMID: 21968359; PMCID: PMC3232818.
11. Shapiro AB, Gu RF, Gao N. Dimerization of isolated *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide transporter component LptA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 450 (4): 1327–32. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.138. Epub 2014 Jul 5. PMID: 25003324.
12. Dovala D, Rath CM, Hu Q, Sawyer WS, Shia S, Elling RA, et al. Structure-guided enzymology of the lipid A acyltransferase LpxM reveals a dual activity mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113 (41): E6064–E6071. DOI: 10.1073/pnas.1610746113. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27681620; PMCID: PMC5068295.
13. Luo Q, Yang X, Yu S, Shi H, Wang K, Xiao L, et al. Structural basis for lipopolysaccharide extraction by ABC transporter LptB₂-FG. *Nat Struct Mol Biol.* 2017; 24 (5): 469–474. DOI: 10.1038/nsmb.3399.
14. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, et al. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (2): 1019–30. DOI: 10.1128/AAC.05829-11. Epub 2011 Nov 21. PMID: 22106224; PMCID: PMC3264203.
15. Disney-McKeethen S, Seo S, Mehta H, Ghosh K, Shamoo Y. Experimental evolution of *Pseudomonas aeruginosa* to colistin in spatially confined microdroplets identifies evolutionary trajectories consistent with adaptation in microaerobic lung environments. *mBio.* 2023; 14 (6): e0150623. DOI: 10.1128/mBio.01506-23.

References

1. Algammal A, Hetta HF, Mabrok M, Behzadi P. Editorial: Emerging multidrug-resistant bacterial pathogens "superbugs": A rising public health threat. *Front Microbiol.* 2023; 14: 1135614. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1135614. PMID: 36819057; PMCID: PMC9930894.
2. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms.* 2020; 8 (11): 1716. DOI: 10.3390/microorganisms8111716. PMID: 33147701; PMCID: PMC7692639.
3. Shahzad S, Willcox MDP, Rayamajhee B. A Review of Resistance to Polymyxins and Evolving Mobile Colistin Resistance Gene *mcr* among Pathogens of Clinical Significance. *Antibiotics (Basel).* 2023; 12 (11): 1597. DOI: 10.3390/antibiotics12111597. PMID: 37998799; PMCID: PMC10668746.
4. Yang B, Liu C, Pan X, Fu W, Fan Z, Jin Y, et al. Identification of Novel PhoP-PhoQ Regulated Genes That Contribute to Polymyxin B Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms.* 2021; 9 (2): 344. DOI: 10.3390/microorganisms9020344. PMID: 33572426; PMCID: PMC7916210.
5. Chebotar IV, Kuleshov KV. Mezhdud antibiotikorezistentnost'ju i virulentnost'ju: dialektika bakterial'nogo fitnessa. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2024; 26 (1): 59-66. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2024.1.59-66>. Russian.
6. Olivares Pacheco J, Alvarez-Ortega C, Alcalde Rico M, Martínez JL. Metabolic Compensation of Fitness Costs Is a General Outcome for Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Mutants Overexpressing Efflux Pumps. *mBio.* 2017; 8 (4): e00500-17. DOI: 10.1128/mBio.00500-17. PMID: 28743808; PMCID: PMC5527304.

- PMC5527304.
7. Sendra E, Fernández-Muñoz A, Zamorano L, Oliver A, Horcajada JP, Juan C, Gómez-Zorrilla S. Impact of multidrug resistance on the virulence and fitness of *Pseudomonas aeruginosa*: a microbiological and clinical perspective. *Infection*. 2024. DOI: 10.1007/s15010-024-02313-x. Epub ahead of print. PMID:38954392.
 8. Shamina OV, Kryzhanovskaja OA, Lazareva AV, Aljabeva NM, Mayanskiy NA. Uстойчивost' karbapenemrezistentnyh shtammov *Klebsiella pneumoniae* k kolistinu: molekulyarnye mehanizmy i bakterial'nyj fitnes. *Vestnik RGMU*. 2020; 3: 11–18. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.032. Russian.
 9. Chebotar I, Savinova T, Bocharova J, Korostin D, Evseev P, Mayanskiy N. Genetic Alternatives for Experimental Adaptation to Colistin in Three *Pseudomonas aeruginosa* Lineages. *Antibiotics*. 2024; 13: 452. Available from: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13050452>.
 10. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55 (12): 5761–9. DOI: 10.1128/AAC.05391-11. Epub 2011 Oct 3. PMID: 21968359; PMCID: PMC3232818.
 11. Shapiro AB, Gu RF, Gao N. Dimerization of isolated *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide transporter component LptA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 450 (4): 1327–32. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.138. Epub 2014 Jul 5. PMID: 25003324.
 12. Dovala D, Rath CM, Hu Q, Sawyer WS, Shia S, Elling RA, et al. Structure-guided enzymology of the lipid A acyltransferase LpxM reveals a dual activity mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113 (41): E6064–E6071. DOI: 10.1073/pnas.1610746113. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27681620; PMCID: PMC5068295.
 13. Luo Q, Yang X, Yu S, Shi H, Wang K, Xiao L, et al. Structural basis for lipopolysaccharide extraction by ABC transporter LptB₂-FG. *Nat Struct Mol Biol*. 2017; 24 (5): 469–474. DOI: 10.1038/nsmb.3399.
 14. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, et al. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56 (2): 1019–30. DOI: 10.1128/AAC.05829-11. Epub 2011 Nov 21. PMID: 22106224; PMCID: PMC3264203.
 15. Disney-McKeethen S, Seo S, Mehta H, Ghosh K, Shamoo Y. Experimental evolution of *Pseudomonas aeruginosa* to colistin in spatially confined microdroplets identifies evolutionary trajectories consistent with adaptation in microaerobic lung environments. *mBio*. 2023; 14 (6): e0150623. DOI: 10.1128/mbio.01506-23.

ЗАВИСИМОСТЬ ИММУНОГЕННОСТИ И РЕАКТОГЕННОСТИ КАНДИДАТНОЙ мРНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЕЗА ОТ ПОЛА ЖИВОТНЫХ И ДОЗЫ ПРЕПАРАТА

В. В. Решетников¹✉, Г. С. Шепелькова², А. В. Рыбакова³, А. П. Трашков³, В. В. Еремеев², Р. А. Иванов¹

¹ Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

² Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

мРНК-вакцины показали высокую эффективность в борьбе с пандемией COVID-19 и другими вирусными инфекциями. Несмотря на интенсивное изучение мРНК-вакцин в последние пять лет, вопрос о безопасности их применения все еще остается актуальным. Целью работы было оценить иммуногенность противотуберкулезной мРНК вакцины в двух дозах у самок и самцов крыс через 2 и 4 недели после вакцинации. В эти же сроки определяли гематологические и биохимические показатели крови. Подтверждена дозозависимость иммуногенности мРНК вакцин как у самок, так и у самцов. Вакцинация привела к умеренной лимфоцитопении и нейтрофилии у самцов крыс, а также к выраженным дозо- и гендерзависимым изменениям в биохимических параметрах крови в различных временных точках. Полученные результаты свидетельствуют об умеренной токсичности противотуберкулезной мРНК вакцины и важности исследования ее токсических действий в различных временных точках у животных обоих полов.

Ключевые слова: мРНК-вакцина, туберкулез, иммуногенность, токсичность

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 формуляцию мРНК в липидные наночастицы.

Вклад авторов: В. В. Решетников — подготовка мРНК вакцины, планирование эксперимента, написание рукописи; Г. С. Шепелькова — постановка экспериментов, анализ результатов; А. В. Рыбакова — постановка экспериментов, анализ результатов; А. П. Трашков — планирование эксперимента, редактирование рукописи; В. В. Еремеев — планирование эксперимента, редактирование рукописи; Р. А. Иванов — планирование эксперимента, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НИЦ «Курчатовский институт» (протокол № 2 от 31 октября 2023 г.), проведено в соответствии с Приказом Минздрава № 755 и Руководством Управления по охране лабораторных животных А5502-01.

✉ **Для корреспонденции:** Василий Владимирович Решетников
Олимпийский пр-т, д. 1, г. Сочи, 354340, Россия; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

Статья получена: 16.09.2024 **Статья принята к печати:** 04.10.2024 **Опубликована онлайн:** 30.10.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.045

THE CANDIDATE ANTI-TUBERCULOSIS mRNA VACCINE IMMUNOGENICITY AND REACTOGENICITY DEPENDENCY ON THE ANIMAL'S SEX AND THE VACCINE DOSE

Reshetnikov VV¹✉, Shepelkova GS², Rybakova AV³, Trashkov AP³, Yermeev VV², Ivanov RA¹

¹ Sirius University of Science and Technology, Sirius, Russia

² Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

³ National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

mRNA vaccines turned out to be highly effective in combating the COVID-19 pandemic and other viral infections. Despite extensive study of mRNA vaccines in the last five years, the issue of safety of their use is still relevant. The study aimed to assess immunogenicity of two anti-tuberculosis mRNA vaccine doses in female and male rats 2 and 4 weeks after vaccination. Hematological and biochemical parameters of blood were determined within the same timeframe. The dose-dependent nature of mRNA vaccine immunogenicity was confirmed in both females and males. Vaccination led to moderate lymphopenia and neutrophilia in male rats, as well as to apparent dose-dependent and sex-related changes in blood biochemistry parameters at various time points. The findings suggest moderate toxicity of the anti-tuberculosis mRNA vaccine and the importance of assessing its toxic effects at various time points in animals of both sexes.

Keywords: mRNA vaccine, tuberculosis, immunogenicity, toxicity

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement No. 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 formulation of mRNA into lipid nanoparticles.

Author contribution: Reshetnikov VV — mRNA vaccine preparation, experimental procedure, manuscript writing; Shepelkova GS — experimental procedure, data analysis; Rybakova AV — experimental procedure, data analysis; Trashkov AP — planning the experiment, manuscript editing; Yermeev VV — planning the experiment, manuscript editing; Ivanov RA — planning the experiment, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the National Research Centre "Kurchatov Institute" (protocol No. 2 dated 31 October 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:** Vasily V. Reshetnikov
Olimpiyskiy prospekt, 1, Sochi, 354340, Russia; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

Received: 16.09.2024 **Accepted:** 04.10.2024 **Published online:** 30.10.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.045

В настоящее время активно ведется разработка новых мРНК-вакцин против различных вирусных и бактериальных инфекций, в том числе туберкулеза, для которых ранее разработанные живые, аттенуированные, рекомбинантные и ДНК-вакцины не показали приемлемой эффективности [1, 2]. Тем не менее существует много пробелов в нашем понимании биологии мРНК-вакцин, доставляемых с помощью липидных наночастиц (ЛНЧ). Известно, что мРНК-ЛНЧ имеют широкое биораспределение, обнаруживаются в большинстве тканей [3, 4], приводят к воспалительному ответу в месте введения и могут быть ассоциированы с нейровоспалением [5]. Накопилось немало свидетельств того, что применение вакцин на основе мРНК в некоторых случаях ассоциировано с развитием аллергических реакций, миокардитов и легочных кровотечений [6]. Вакцинирование мРНК-ЛНЧ в некоторых случаях приводит к отложенным во времени транскриптомным изменениям и умеренным изменениям уровня метилирования CpG-островков в периферических моноцитах крови [7]. Кроме того, сведений о биораспределении, а также времени элиминации мРНК вакцин и кодируемых ими антигенов недостаточно [4].

В доклинических испытаниях мРНК вакцин RNA-1273 и BNT162b2 против COVID-19 на крысах в первые сутки после вакцинации были показаны умеренное снижение массы и повышение температуры тела животных. Были выявлены также провоспалительные гематологические и биохимические изменения, повышение уровня цитокинов [8, 9]. Макроскопические изменения включали увеличение массы селезенки, печени и надпочечников, микроскопические — умеренное воспаление в месте инъекции, в паховой области, в подвздошных и подколечных лимфатических узлах, а также признаки воспаления в печени и селезенке. Все изменения носили дозозависимый характер, большинство показателей вернулось в состояние нормы через 2–3 недели после введения последней дозы препарата [8, 9]. Клинические исследования мРНК-вакцин RNA-1273, BNT162b2 и CS-2034 [10–12] тоже показали дозозависимые, местнораздражающие и системные нежелательные эффекты у некоторых участников, которые включали в себя воспаление в месте введения, усталость, головную боль, озноб, мышечную боль и боль в суставах, гематологические и биохимические изменения параметров крови. Нежелательные эффекты мРНК препаратов могут быть связаны как с действующим веществом вакцины — молекулой мРНК, так и с кодируемыми ею антигенами или липидными наночастицами, в которых инкапсулирована РНК.

Ранее мы показали, что разработанная нами противотуберкулезная мРНК-вакцина приводит к формированию адаптивного и протективного иммунного ответа [13]. Однако безопасность ее использования оставалась невыясненной. Цель данной работы — оценить токсическое действие двукратного введения противотуберкулезной мРНК-вакцины по изменению гематологических и биохимических параметров крови у самцов и самок крыс через 2 и 4 недели после вакцинации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В эксперименте использовали 30 самок (126–149 г) и 30 самцов (154–180 г) крыс Wistar SPF-статуса возрастом 8–12 недель. Исследования проводили на базе питомника НИЦ Курчатowski институт, животных содержали в

SPF-условиях при фиксированном световом режиме 12.00 : 12.00 ч и доступом к корму и воде *ad libitum*.

Дизайн эксперимента

Для работы было сформировано три экспериментальные группы, в каждой из них по 10 самцов и 10 самок:

группа I: группа с введением мРНК вакцины МТВ-мEr5-1 в дозе 5 мкг/животное;

группа II: группа с введением мРНК вакцины МТВ-мEr5-1 в дозе 15 мкг/животное;

группа III: группа с введением фосфатного буфера (PBS). мРНК-вакцину или фосфатный буфер вводили экспериментальным животным двукратно с интервалом в 14 дней внутримышечно в область бедра с помощью трехкомпонентного инсулинового шприца с диаметром иглы 26 G в объеме 200 мкл (рис. 1А). Животные были подвергнуты эвтаназии наркотизацией тилетамин/золазепамом и ксилазином в дозах 15 мг/кг и 6 мг/кг соответственно, с последующим обескровливанием полостей сердца и забором селезенки и паховых лимфоузлов. По пять самцов и пять самок из каждой группы были умерщвлены на 16-й день эксперимента (через 24 ч после повторного введения препарата), остальные животные — на 29-й день (через две недели после повторного введения препарата). У всех животных после умерщвления из полостей сердца была забрана кровь для клинического и биохимического анализа. Кроме того, для оценки иммуногенности мРНК вакцин были забраны паховые лимфоузлы и селезенка.

Используемые дозы мРНК вакцин соотносятся с дозой мРНК вакцины CVnCoV против COVID-19, которая в настоящее время проходит клинические испытания [NCT04652102]. МТВ-мEr5-1 — вакцина с немодифицированным нуклеотидным составом (без использования аналогов уридина). Доза мРНК вакцины CVnCoV соответствует 12 мкг. Выбранные нами дозы исследуемой кандидатной вакцины — 5 и 15 мкг — являются близкими к дозам, используемым в клиническом исследовании, но без поправки на вес животного.

Вакцина МТВ-мEr5-1

Мультиэпитопная мРНК вакцина МТВ-мEr5-1 соответствует вакцине 5'-TPL-mEpitope-mRNA1273-3', описанной ранее с незначительными модификациями [13]. В процессе *in vitro* транскрипции в качестве аналога кэпа был использован m7G(3'OMe)pppA(2'OMe)pG («Биолабмикс»; Россия) в концентрации 2,4 мм. Для специфической встройки этого аналога кэпа в процессе котранскрипционного экпирования после последовательности T7 промотора в последовательность ДНК плазмиды был добавлен один аденин. Последовательность мРНК МТВ-мEr5-1 представлена в Приложении 1.

Остальные описанные ранее [13] этапы наработки мРНК вакцинного препарата оставались без изменения. Формуляцию мРНК в липидные наночастицы осуществляли с помощью микрофлюидного картриджа на приборе NanoAssemblr™ Benchtop (Precision NanoSystems Inc; Канада). Частицы были сконцентрированы и стерилизованы с помощью PES-мембраны с диаметром пор 0,22 мкм. До момента введения препарата липидные наночастицы хранили при +4 °C не более 3 недель.

Аналитическую характеристику полученных частиц проводили, как описано ранее [13], она включала оценку

их размера, индекса полидисперсности, дзета-потенциала, процента загрузки мРНК в частицы и ее целостности. Размер частиц во всех экспериментальных группах был в диапазоне 86–88 нм, дзета-потенциал — в диапазоне от –3 до –2 мВ, индекс полидисперсности не превышал 0,1. Уровень загрузки РНК был более 90%, целостность РНК согласно данным капиллярного электрофореза — более 85%.

Гематологический и биохимический анализ крови

Для гематологических исследований кровь была собрана из полостей сердца в пробирки с антикоагулянтом (КЗ-ЭДТА), исследование проводили на гематологическом анализаторе DIATRON Abacus Junior 22.5. В образцах цельной крови определяли количество эритроцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, количество лейкоцитов, количество тромбоцитов и лейкоцитарную формулу.

Для биохимического анализа крови образцы были забраны в пробирки с разделительным гелем, центрифугированы для получения сыворотки при 3000 г. В сыворотке была определена концентрация аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), мочевины, щелочной фосфатазы, общего билирубина, общего белка, глюкозы на биохимическом анализаторе Architect c8000 (Abbott, США).

Определение количества IFN γ -продуцирующих клеток

Уровень протективного Т-клеточного иммунного ответа оценивали по количеству выделенных из селезенки и паховых лимфоузлов клеток, секретирующих IFN γ в ответ на стимуляцию микобактериальными антигенами (соникат *M. tuberculosis*) (10 мкг/мл) или рекомбинантным белком ESAT6 в концентрации 10 мкг/мл (методика получения ESAT6 описана ранее [14]) методом ELISPOT при помощи наборов Mouse IFN γ ELISpot Set (BD; США) и AEC Substrate Set (BD; США) в соответствии с рекомендациями изготовителей.

Статистический анализ данных

Все данные были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk's W test). Были рассчитаны медиана и квартильный размах (Q_{25} – Q_{75}); межгрупповые сравнения (post hoc analysis) проведены с использованием критерия Тьюки (Tukey's test analysis). Для комплексной оценки данных независимых групп в контрольных точках исследования был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Статистическую значимость определяли при $p < 0,05$. Статистический анализ был выполнен с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка иммуногенности

Мы оценили влияние дозы вакцины на формирование адаптивного иммунного ответа у самок и самцов крыс в двух временных точках. Обнаружено значимое влияние иммунизации на уровень IFN γ -продуцирующих клеток (ИПК) после специфической стимуляции как в селезенке, так и в паховом лимфоузле (рис. 1Б). Однако количество ИПК в селезенке было значительно выше. Мы также наблюдали выраженные различия в уровне ИПК на лунку в зависимости от типа специфической стимуляции (белок

ESAT6 или соникат *M. tb*) как для клеток лимфоузла, так и для клеток селезенки в обеих временных точках. По всей вероятности, эти эффекты объясняются различной концентрацией целевого антигена в препарате, используемом для специфической стимуляции.

Оценка динамики формирования адаптивного иммунного ответа показала, что более выраженный ответ происходит на 29-й день эксперимента, через две недели после второй вакцинации, что хорошо согласуется с литературными данными.

Дозозависимые эффекты наблюдались после стимуляции ESAT6: на 16-й день эксперимента в клетках лимфоузлов уровень ИПК в группе I с введением дозы 5 мкг был выше, чем в группе II, и на 29-й день эксперимента в клетках селезенки уровень ИПК был почти в 2 раза выше у группы II по сравнению с группой I. Значимых различий в степени выраженности адаптивного иммунного ответа между самцами и самками не наблюдалось ($p > 0,05$).

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что двукратное внутримышечное введение мРНК-вакцины МТВ-мEr5-1 крысам приводит к формированию адаптивного иммунного ответа, который детектируется в двух исследуемых временных точках, и степень его выраженности зависит от дозы, но не от пола животного.

Оценка гематологических и биохимических изменений в крови

Мы не обнаружили существенного влияния вакцинации на показатели изучаемых параметров крови экспериментальных животных. Значимых изменений у самок всех экспериментальных групп в двух временных точках не наблюдалось (табл. 1). Лишь у самцов, иммунизированных вакциной МТВ-мEr5-1 в дозе 15 мкг, на 16-е сутки исследования отмечалось значимое снижение медианных значений абсолютного ($1,97 \times 10^9/\text{л}$ против $3,78 \times 10^9/\text{л}$ в группе PBS) и относительного уровня лимфоцитов (лимфоцитопения) и повышение медианных значений абсолютного ($2,64 \times 10^9/\text{л}$ против $0,89 \times 10^9/\text{л}$ в группе PBS) и относительного уровня нейтрофилов (нейтрофилия). Однако эти параметры пришли в норму через две недели после второго введения вакцины, на 29-й день эксперимента.

При анализе основных биохимических показателей крови у получавших тестируемый препарат экспериментальных животных на 16-е и 29-е сутки исследования отмечались существенные изменения показателей результатов биохимического анализа. У самок крыс на 16-й день эксперимента вакцинация оказала влияние на уровень АЛТ, АСТ и общий белок в крови (ANOVA: $F(2,12) = 4,03$, $p = 0,046$; $F(2,12) = 8,58$, $p = 0,005$; $F(2,12) = 9,05$, $p = 0,004$ соответственно). Самки, иммунизированные МТВ-мEr5-1 в дозе 15 мкг, демонстрировали повышение уровня АЛТ и АСТ и снижение уровня общего белка в крови. Самки, иммунизированные МТВ-мEr5-1 в дозе 5 мкг, демонстрировали только повышение уровня АСТ. В то же время у самцов подобных изменений в биохимических показателях крови обнаружено не было.

На 29-й день эксперимента, изменения большинства биохимических параметров у самок крыс экспериментальных групп было нивелировано, за исключением АЛТ [ANOVA: $F(2,12) = 14,12$, $p = 0,001$], который оставался повышенным в группе МТВ-мEr5-1 15 мкг. Напротив, у самцов на 29-й день эксперимента вакцинация привела к изменению большинства биохимических параметров крови, АЛТ

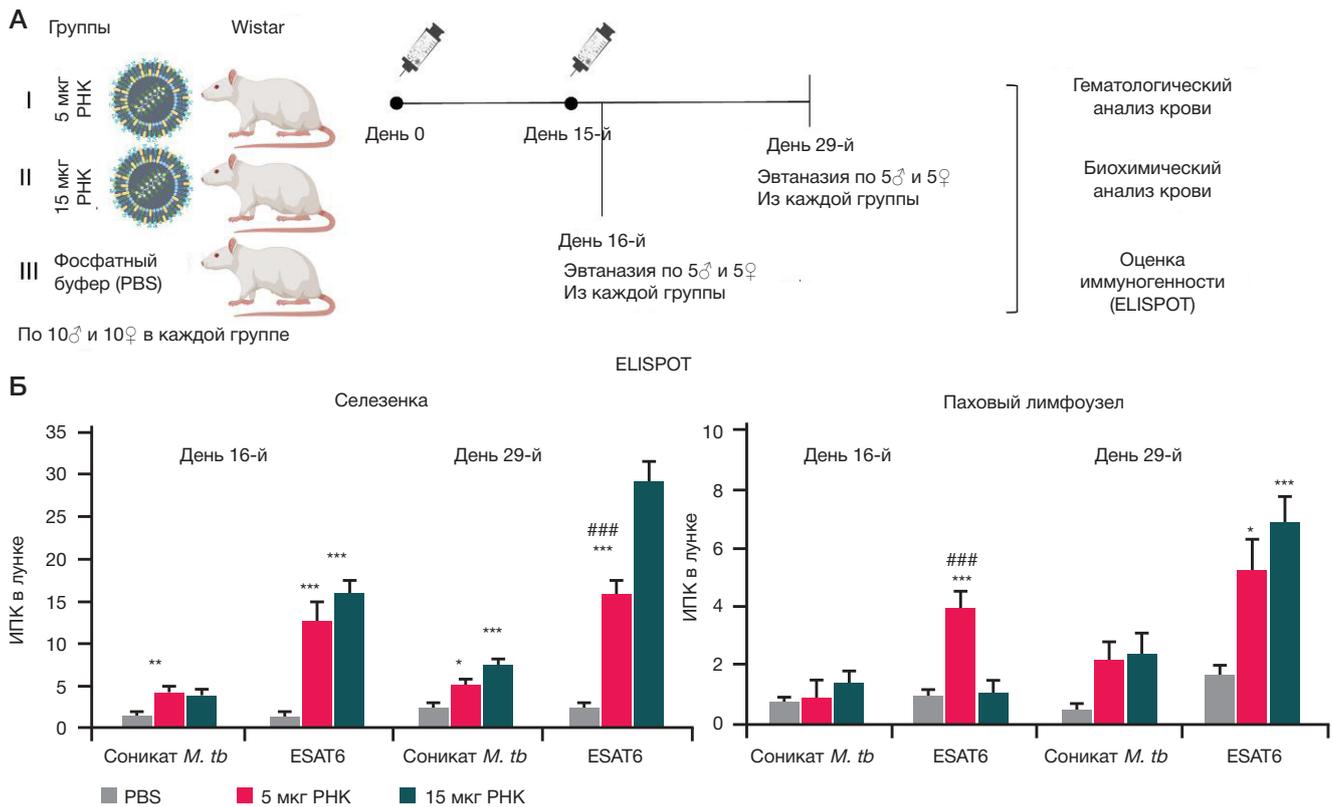


Рис. 1. Оценка иммуногенности мРНК вакцины. **А.** Экспериментальный дизайн. **Б.** Данные анализа ELISPOT на клетках селезенки и паховых лимфоузлов. ИПК — IFN γ -продуцирующие клетки. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с соответствующей контрольной группой (PBS); ### — $p < 0,001$ по сравнению с группой 15 мкг РНК

($F(2,12) = 7,65, p = 0,007$], АСТ ($F(2,12) = 8,13, p = 0,006$), мочевины ($F(2,12) = 6,5, p = 0,012$) и уровень общего белка ($F(2,12) = 5,2, p = 0,024$). Наши результаты показывают, что уровни мочевины, АЛТ и АСТ были повышены в обеих экспериментальных группах, вне зависимости от дозы мРНК-вакцины. В то же время на повышение и снижение уровня общего белка у экспериментальных групп выраженное влияние оказывала доза вводимой мРНК-вакцины.

Таким образом, иммунизация мРНК-вакциной МТВ-мEr5-1 привела к выраженным зависимым от пола животных и дозы вакцины изменениям биохимических параметров крови в разных временных точках у самок и самцов крыс. В то же время влияние вакцинации МТВ-мEr5-1 на гематологические параметры крови было умеренным (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вакцинация зачастую приводит к побочным реакциям воспалительного генеза, которые могут включать боль в месте инъекции, покраснение или отек, а также системные симптомы, такие как повышение температуры тела и изменение клеточного состава крови [15]. мРНК-вакцины обладают иммуностимулирующими свойствами как за счет самой молекулы РНК, так и за счет компонентов липидных наночастиц [16]. Попадая в клетку, РНК может распознаваться внутриклеточными рецепторами, включая толл-подобные рецепторы 3 и 7, что приводит к активации сигнальных путей врожденного иммунитета [16, 17].

Мы показали, что через сутки после второго введения наибольшей дозы вакцинного препарата у самцов крыс наблюдается лимфоцитопения и нейтрофилия, которые нивелируются через две недели после введения мРНК-вакцины. Эти данные хорошо согласуются с результатами

доклинических исследований других мРНК-вакцинных препаратов, таких как RNA-1273, BNT162b2 [8, 9], в которых также в первые сутки после введения наблюдалось повышение уровня цитокинов в крови, увеличение количества лейкоцитов, нейтрофилов и эозинофилов, снижение лимфоцитов. Известно, что умеренный воспалительный ответ необходим для формирования адаптивного иммунитета. В недавнем исследовании [18] было также показано, что более выраженные воспалительные ответы на введение вакцины коррелируют с формированием более сильного адаптивного иммунного ответа. В нашем исследовании введение повышенной дозы (15 мкг) вакцины помимо изменения клеточного состава крови приводило к более выраженному адаптивному иммунному ответу.

В отличие от краткосрочных изменений гематологических параметров биохимические изменения, ассоциированные с воспалением, были более стабильными. По нашим данным, даже через 2 недели после второго введения препарата у самок был повышен уровень АЛТ, а у самцов были повышены АЛТ, АСТ, мочевины и снижен уровень общего белка. Изменения этих биохимических параметров могут быть связаны с нарушениями в работе печени и почек. Мы провели гистологический анализ органов животных (данные не представлены) и обнаружили микроскопические признаки воспаления в печени (дозозависимое нарастание признаков продуктивного васкулита: утолщение стенок сосудов, инфильтрация лимфоцитами, очаговые скопления лимфоцитов и макрофагов). В то же время в почках микроскопических признаков воспаления найдено не было.

Биохимические изменения в крови и микроскопические изменения печени были зарегистрированы также в доклинических исследованиях мРНК-вакцин, проведенных компаниями BioNTech и Moderna [8, 9]. В этих исследованиях

Таблица 1. Гематологические показатели крови

Группа	Пол	WBC 10 ⁹ /л	Neu%	Lym%	Mon%	Eos%	Bas%	RBC 10 ¹² /л	HGB г/л	HCT	PLT 1012/л	
16-й день исследования												
Физиологический раствор (PBS)	♂	Медиана	5,86	24,9	67,9	5,9	1,1	0,1	6,3	146	38,4	684
		Q25-Q75	5,74-5,87	24 25,4	67,5-68,9	4,6-6,5	1-1,5	0,1-0,1	6,1-6,4	144-146	38,2-38,4	678-936
	♀	Медиана	4,06	21,1	72,5	4,6	2	0,1	6,03	137	36,7	1197
		Q25-Q75	3,67-4,45	20,0-21,6	71,7-72,5	3,9-4,6	1,1-2,6	0,00-0,10	5,99-6,33	135-144	36,5-38,9	925-1311
MTB-mEp5-1 5 мкг	♂	Медиана	5,78	33,6	57,6	6,3	1,4	0,2	6	137	36,3	1054
		Q25-Q75	5,55-6,44	29,4-34,5	55,9-63,6	5,7-6,3	1,3-1,4	0,1-0,2	5,9-6,1	136-137	35,9-37,2	987-1079
	♀	Медиана	5,01	32,3	59,5	6,4	1,4	0,1	6,1	138	37,2	990
		Q25-Q75	4,6-5,63	28,4-37,4	54,5-68,0	4,3-6,5	1,2-1,5	0,10-0,20	5,99-6,20	138-139	37,1-38,1	951-1011
MTB-mEp5-1 15 мкг	♂	Медиана	4,69	51,1*	38,8*	7,3	1,5	0,2	5,9	132	35	978
		Q25-Q75	3,67-6,19	48,6-54,9	38-42,4	5,6-8,7	1,3-1,6	0,1-0,2	5,8-6,0	131 134	34,2-35,3	908-985
	♀	Медиана	3,51	31,1	64	4,6	1,7	0,1	6,07	139	38	867
		Q25-Q75	2,87-4,29	26,4-35,7	56,3-66,6	3,9-4,8	1,6-2,1	0,10-0,10	6,07-6,21	139-145	37,5-38,2	845-906
29-й день исследования												
Физиологический раствор (PBS)	♂	Медиана	5,7	42,2	51	5,1	1,5	0,1	6,39	143	36,5	780
		Q25-Q75	5,63-6,03	37,3-44,1	48,9-56,5	4,6-5,6	1,2-1,6	0,00-0,10	6,34-6,45	141-147	35,7-36,7	774-850
	♀	Медиана	3,39	31,3	61,3	5,1	1,7	0,1	6,38	139	36,4	734
		Q25-Q75	3,02-3,44	30,8-32,7	60,7-61,3	4,5-5,3	1,4-2	0,1-0,2	6,16-6,44	139-141	36,2-36,5	696-781
MTB-mEp5-1 5 мкг	♂	Медиана	6,38	25	69,6	4,2	1,2	0,1	6,58	142	37,5	738
		Q25-Q75	6,13-7,56	24,8-25,5	65,2-69,7	4,1-5,3	1,1-1,3	0-0,1	6,45-6,92	142-148	37-40,4	711-796
	♀	Медиана	4,1	22,9	70,7	4,5	1,4	0,1	6,91	156	39,9	780
		Q25-Q75	3,88-4,71	22,7-25,4	69,5-71,7	4-4,8	1,2-1,6	0,1-0,2	6,76-7,01	151-156	39,3-40,3	737-852
MTB-mEp5-1 15 мкг	♂	Медиана	6,9	26,2	66,1	5	1,1	0,1	6,53	145	36,8	797
		Q25-Q75	6,19-7,41	25,9-27,6	65,5-67,4	4,6-5,8	0,9-1,3	0,1-0,2	6,42-6,66	143-149	36,6-38,1	791-845
	♀	Медиана	5,05	23,1	72,6	4,2	1	0,1	6,18	135	35,2	834
		Q25-Q75	4,41-6,49	22,1-24,9	69-74,2	1,7-4,6	0,9-1,1	0-0,1	6,15-6,19	135-136	34,9-35,6	782-922

Примечание: данные представлены в виде медианы и квартильного размаха (Q25-Q75). Данные по абсолютным значениям лимфоцитов и нейтрофилов не приведены, но статистическая достоверность между группами повторяется и при сравнении абсолютных значений. * — отличие от контрольных значений достоверно на принятом уровне значимости ($p < 0,05$). WBC (white blood cells) — белые кровяные тельца; Neu% — относительное содержание нейтрофилов; Lym% — относительное содержание лимфоцитов; Mon% — относительное содержание моноцитов; Eos% — относительное содержание эозинофилов; Bas% — относительное содержание базофилов; RBC (red blood cells) — абсолютное содержание эритроцитов; HGB (hemoglobin) — концентрация гемоглобина; HCT (hematocrit) — гематокрит; PLT (platelets) — абсолютное содержание тромбоцитов.

у части животных также отмечались повышение уровня АСТ, мочевины, щелочной фосфатазы, триглицеридов, холестерина, билирубина и снижение уровня общего белка. Эти изменения сопровождались структурными изменениями в печени, которые заключались в увеличении массы органа, гепатоцитарной вакуолизации, гипертрофии клеток Купфера, единичных некрозах клеток или дегенерации гепатоцитов. Однако авторы не уточняют в доклиническом отчете, через какой период времени биохимические и гистологические показатели приходят в норму после вакцинации.

В доклиническом исследовании мРНК вакцины BNT162b2 авторы предполагают, что вакуолизация клеток печени может быть связана со специфическим накоплением ионизируемых липидов ALC-0315 [9]. Другие липидные компоненты, такие как SM102, ALC-0159 или PEG2000-DMG, также могут обладать токсичностью в больших дозах, однако используемые дозы в вакцине значительно меньше и предположительно не должны оказывать токсичных воздействий [8, 9, 19].

В нашей работе также были использованы липиды ALC-0315, SM-102, которые, как уже отмечалось, способны активировать врожденный иммунный ответ [16]. Значимым отличием нашей вакцины MTB-mEp5-1 от вакцин RNA-1273 и BNT162b2 является использование в последовательности РНК немодифицированного уридина. Последний является

сильным стимулятором врожденного иммунитета в отличие от N1-метилпсевдоуридина, который был использован в вакцинах RNA-1273 и BNT162b2 [16, 17].

По всей вероятности, чрезмерная активация врожденного иммунитета как за счет немодифицированной РНК, так и за счет липидных компонентов может привести к более выраженному и продолжительному воспалительному процессу. Следует отметить, что чрезмерная иммунная активация может вызывать повреждение ткани печени и сопровождаться изменением биохимических параметров крови. Однако подобные случаи встречаются крайне редко (один на 14 млн случаев) при использовании различных вакцин, в том числе RNA-1273 и BNT162b2, и связаны с развитием аутоиммунных процессов [20].

Особого внимания заслуживают различия в выраженности влияния вакцинации MTB-mEp5-1 на биохимические параметры крови у самок и самцов. Наши результаты показывают, что через сутки после бустерной дозы мРНК вакцины различия в биохимических параметрах крови детектировались только у самок. В то же время через две недели после второй вакцинации более выраженные изменения детектировались у самцов. Эти различия могут быть обусловлены как различиями физиологических концентраций вакцины, связанными с весом животных (вес самцов был на 15–20% больше), так и другими физиологическими особенностями (уровень

Таблица 2. Биохимические показатели крови

Группа	Пол	Оцениваемые показатели						
		АЛТ, ЕД/л	АСТ, ЕД/л	Мочевина, мМ/л	Щелочная фосфатаза, ЕД/л	Общий билирубин, мкМ/л	Общий белок, г/л	Глюкоза, мм/л
16-й день исследования								
Физиологический раствор (PBS)	♂	78; 66–80	72; 69–94	4,6; 4,3–5,1	353; 339–362	18,9; 16,6–21,1	59; 58–62	4,9; 4,8–5,0
	♀	73; 71–90	66; 64–73	5,0; 4,8–5,3	382; 350–402	17,1; 15,5–20,3	61; 59–66	4,7; 4,7–5,0
МТВ-мЕр5-1 5 мкг	♂	78; 75–101	82; 70–92	4,8; 4,1–5,2	381; 377–420	18,0; 16,6–19,4	54; 51–59	5,0; 4,9–5,2
	♀	82; 70–96	92*; 65–95	4,4; 4,4–4,7	390; 382–408	18,0; 15,2–18,4	57; 55–59	4,3; 4,1–4,5
МТВ-мЕр5-1 15 мкг	♂	99; 81–114	98; 87–110	4,9; 4,9–4,9	364; 361–400	18,8; 17,2–20,0	53; 51–54	4,6; 4,2–4,8
	♀	104*; 93–110	106*; 101–111	5,1; 4,0–5,2	401; 385–414	18,0; 16,2–18,9	50*; 49–52	4,3; 4,3–4,5
29-й день исследования								
Физиологический раствор (PBS)	♂	73; 69–77	78; 71–80	4,2; 4,2–4,5	370; 364–402	19,5; 17,5–19,5	57; 55–60	5,0; 4,8–5,1
	♀	77; 75–78	83; 75–83	4,8; 4,5–4,9	361; 351–380	18,3; 18,2–19,1	56; 54–57	5,0; 5,0–5,3
МТВ-мЕр5-1 5 мкг	♂	85*; 80–88	96*; 90–97	5,2*; 5,0–5,4	401; 400–414	20,4; 19,2–20,5	55; 53–55	5,1; 4,9–5,5
	♀	82; 82–90	90; 83–101	5,2; 4,4–5,3	388; 383–397	20,1; 19,0–21,0	52; 50–53	4,3; 4,2–4,7
МТВ-мЕр5-1 15 мкг	♂	99*; 92–101	101*; 93–107	5,3*; 5,1–5,6	387; 385–410	20,0; 18,3–20,6	52*; 50–52	5,0; 4,1–5,0
	♀	105*; 96–110	102; 97–114	5,2; 4,8–5,5	415; 402–416	20,9; 19,7–21,1	50; 50–52	4,9; 4,8–5,2

Примечание: данные представлены в виде медианы и квартильного размаха (Q_{25} – Q_{75}). * — отличие от контрольных значений достоверно при принятом уровне значимости ($p < 0,05$).

половых гормонов), генетическими различиями (включая экспрессию X-сцепленных генов) [21]. Различия в уровне половых стероидных гормонов оказывают влияние на функционирование иммунных клеток, что приводит к различиям в активности иммунного ответа [21]. В частности, результаты клинических исследований свидетельствуют о том, что у женщин наблюдается более высокий уровень выработки антител и более выраженный клеточный ответ после вакцинации [21, 22]. Вакцинация мРНК- или другими вакцинами приводит у женщин к более частым побочным эффектам, таким как повышение температуры тела, боль и местное воспаление [22, 23]. Таким образом, литературные данные о гендерспецифичных эффектах вакцинации согласуются с нашими результатами, которые показывают, что введение МТВ-мЕр5-1 вызывает у самок

более быстрые изменения в биохимических параметрах крови. Эти изменения, по всей видимости, связаны с более высокой иммунореактивностью самок крыс на компоненты мРНК-вакцины.

Выводы

Результаты нашего исследования свидетельствуют о высокой реактогенности вакцины МТВ-мЕр5-1 на основе немодифицированной РНК. Признаки воспаления в исследованных органах и устойчивое изменение показателей биохимического анализа крови животных являются основанием для расширенного изучения безопасности и механизмов специфической фармакологической активности тестируемого препарата.

Литература

- Matarazzo L, Bettencourt PJG. mRNA vaccines: a new opportunity for malaria, tuberculosis and HIV. *Front Immunol.* 2023;14: 1172691.
- Kazakova A, Zhelnov P, Sidorov R, Rogova A, Vasileva O, et al. DNA and RNA vaccines against tuberculosis: a scoping review of human and animal studies *Frontiers in Immunology.* 2024; 15.
- Ndeupen S, Qin Z, Jacobsen S, Bouteau A, Estanbouli H, et al. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience.* 2021; 24: 103479.
- Pateev I, Seregina K, Ivanov R, Reshetnikov V. Biodistribution of RNA Vaccines and of Their Products: Evidence from Human and Animal Studies. *Biomedicines.* 2023; 12.
- Kirshina AKA, Kolosova E, Imasheva E, Vasileva O, Zaborova O, Terenin I, Muslimov A, Reshetnikov V. Effects of various mRNA-LNP vaccine doses on neuroinflammation in BALB/c mice. *RSMU.* 2022; 6.
- van den Ouweland F, Charpentier N, Tureci O, Rizzi R, Mensa FJ, et al. Safety and reactogenicity of the BNT162b2 COVID-19 vaccine: Development, post-marketing surveillance, and real-world data. *Hum Vaccin Immunother.* 2024; 20: 2315659.
- Pang APS, Higgins-Chen AT, Comite F, Raica I, Arboleda C, et

- al. Longitudinal Study of DNA Methylation and Epigenetic Clocks Prior to and Following Test-Confirmed COVID-19 and mRNA Vaccination. *Front Genet.* 2022; 13: 819749.
8. European Medicines Agency. Moderna Assessment Report COVID-19 Vaccine Moderna. 2021.
 9. European Medicines Agency. Assessment report: Comirnaty. 2021.
 10. Jin Z, Wu J, Wang Y, Huang T, Zhao K, et al. Safety and immunogenicity of the COVID-19 mRNA vaccine CS-2034: A randomized, double-blind, dose-exploration, placebo-controlled multicenter Phase I clinical trial in healthy Chinese adults. *J Infect.* 2023; 87: 556–70.
 11. Jackson LA, Anderson EJ, Roupheal NG, Roberts PC, Makhene M, et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2020; 383: 1920–31.
 12. Walsh EE, Frenck RW, Jr, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med.* 2020; 383: 2439–50.
 13. Reshetnikov V, Terenin I, Shepelkova G, Yermeev V, Kolmykov S, et al. Untranslated Region Sequences and the Efficacy of mRNA Vaccines against Tuberculosis. *Int J Mol Sci.* 2024; 25.
 14. Vasileva O, Krapivin B, Muslimov A, Kukushkin I, Pateev I, Rybtsov S, 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.
 15. Teijaro JR, Farber DL. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nat Rev Immunol.* 2021; 21: 195–7.
 16. Verbeke R, Hogan MJ, Lore K, Pardi N. Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. *Immunity.* 2022; 55: 1993–2005.
 17. Muslimov A, Tereshchenko V, Shevyrev D, Rogova A, Lepik K, et al. The Dual Role of the Innate Immune System in the Effectiveness of mRNA Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2023; 24.
 18. Zhuang CL, Lin ZJ, Bi ZF, Qiu LX, Hu FF, et al. Inflammation-related adverse reactions following vaccination potentially indicate a stronger immune response. *Emerg Microbes Infect.* 2021; 10: 365–75.
 19. Kang DD, Hou X, Wang L, Xue Y, Li H, et al. Engineering LNPs with polysarcosine lipids for mRNA delivery. *Bioact Mater.* 2024; 37: 86–93.
 20. Schinas G, Polyzoou E, Dimakopoulou V, Tsoupra S, Gogos C, et al. Immune-mediated liver injury following COVID-19 vaccination. *World J Virol.* 2023; 12: 100–8.
 21. Flanagan KL, Fink AL, Plebanski M, Klein SL. Sex and Gender Differences in the Outcomes of Vaccination over the Life Course. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2017; 33: 577–99.
 22. Klein SL, Jedlicka A, Pekosz A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10: 338–49.
 23. Bignucolo A, Scarabel L, Mezzalana S, Polesel J, Cecchin E, et al. Sex Disparities in Efficacy in COVID-19 Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Vaccines (Basel).* 2021; 9.

References

1. Matarazzo L, Bettencourt PJG. mRNA vaccines: a new opportunity for malaria, tuberculosis and HIV. *Front Immunol.* 2023;14: 1172691.
2. Kazakova A, Zhelnov P, Sidorov R, Rogova A, Vasileva O, et al. DNA and RNA vaccines against tuberculosis: a scoping review of human and animal studies *Frontiers in Immunology.* 2024; 15.
3. Ndeupen S, Qin Z, Jacobsen S, Bouteau A, Estantouli H, et al. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience.* 2021; 24: 103479.
4. Pateev I, Seregina K, Ivanov R, Reshetnikov V. Biodistribution of RNA Vaccines and of Their Products: Evidence from Human and Animal Studies. *Biomedicines.* 2023; 12.
5. Kirshina AKA, Kolosova E, Imasheva E, Vasileva O, Zaborova O, Terenin I, Muslimov A, Reshetnikov V. Effects of various mRNA-LNP vaccine doses on neuroinflammation in BALB/c mice. *RSMU.* 2022; 6.
6. van den Ouweland F, Charpentier N, Tureci O, Rizzi R, Mensa FJ, et al. Safety and reactogenicity of the BNT162b2 COVID-19 vaccine: Development, post-marketing surveillance, and real-world data. *Hum Vaccin Immunother.* 2024; 20: 2315659.
7. Pang APS, Higgins-Chen AT, Comite F, Raica I, Arboleda C, et al. Longitudinal Study of DNA Methylation and Epigenetic Clocks Prior to and Following Test-Confirmed COVID-19 and mRNA Vaccination. *Front Genet.* 2022; 13: 819749.
8. European Medicines Agency. Moderna Assessment Report COVID-19 Vaccine Moderna. 2021.
9. European Medicines Agency. Assessment report: Comirnaty. 2021.
10. Jin Z, Wu J, Wang Y, Huang T, Zhao K, et al. Safety and immunogenicity of the COVID-19 mRNA vaccine CS-2034: A randomized, double-blind, dose-exploration, placebo-controlled multicenter Phase I clinical trial in healthy Chinese adults. *J Infect.* 2023; 87: 556–70.
11. Jackson LA, Anderson EJ, Roupheal NG, Roberts PC, Makhene M, et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2020; 383: 1920–31.
12. Walsh EE, Frenck RW, Jr, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med.* 2020; 383: 2439–50.
13. Reshetnikov V, Terenin I, Shepelkova G, Yermeev V, Kolmykov S, et al. Untranslated Region Sequences and the Efficacy of mRNA Vaccines against Tuberculosis. *Int J Mol Sci.* 2024; 25.
14. Vasileva O, Krapivin B, Muslimov A, Kukushkin I, Pateev I, Rybtsov S, 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.
15. Teijaro JR, Farber DL. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nat Rev Immunol.* 2021; 21: 195–7.
16. Verbeke R, Hogan MJ, Lore K, Pardi N. Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. *Immunity.* 2022; 55: 1993–2005.
17. Muslimov A, Tereshchenko V, Shevyrev D, Rogova A, Lepik K, et al. The Dual Role of the Innate Immune System in the Effectiveness of mRNA Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2023; 24.
18. Zhuang CL, Lin ZJ, Bi ZF, Qiu LX, Hu FF, et al. Inflammation-related adverse reactions following vaccination potentially indicate a stronger immune response. *Emerg Microbes Infect.* 2021; 10: 365–75.
19. Kang DD, Hou X, Wang L, Xue Y, Li H, et al. Engineering LNPs with polysarcosine lipids for mRNA delivery. *Bioact Mater.* 2024; 37: 86–93.
20. Schinas G, Polyzoou E, Dimakopoulou V, Tsoupra S, Gogos C, et al. Immune-mediated liver injury following COVID-19 vaccination. *World J Virol.* 2023; 12: 100–8.
21. Flanagan KL, Fink AL, Plebanski M, Klein SL. Sex and Gender Differences in the Outcomes of Vaccination over the Life Course. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2017; 33: 577–99.
22. Klein SL, Jedlicka A, Pekosz A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10: 338–49.
23. Bignucolo A, Scarabel L, Mezzalana S, Polesel J, Cecchin E, et al. Sex Disparities in Efficacy in COVID-19 Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Vaccines (Basel).* 2021; 9.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОРТРЕТЫ ХАНТОВ И МАНСИ ПО ГАПЛОГРУППАМ Y-ХРОМОСОМЫ В КОНТЕКСТЕ ГЕНОФОНДОВ РОССИИ

Г. Ю. Пономарёв ✉, А. Т. Агджоян, А. Ю. Потанина, Д. С. Адамов, Е. В. Балановская

Медико-генетический научный центр имени академика Н. П. Бочкова, Москва, Россия

Ханты и манси — коренные малочисленные народы Западной Сибири с уникальными культурными, антропологическими и лингвистическими особенностями. Изучение их генофонда позволяет реконструировать генетическую структуру населения, говорившего на угорских языках, от которого в современности сохранились только ханты, манси, а также венгры, в чьем генофонде присутствуют следы средневековой миграции угорязычных мадьяр. Детальная характеристика генофонда хантов и манси важна для реконструкции угорских популяций и генетической истории региона. Целью исследования было изучить репрезентативные выборки хантов ($n = 83$) и манси ($n = 74$) на основе базовой панели из 60 SNP-маркеров и углубленной панели 74 SNP-маркеров Y-хромосомы статистическими и картографическими методами в контексте коренного народонаселения Урала и Западной Сибири. Выявлены различия генофондов хантов и манси и по базовой панели гаплогрупп Y-хромосомы, и по ветвям гаплогрупп N2 и N3a4. Основная часть генофонда хантов равномерно распределена между N2-Y3195 (26%), N2-VL67 (23%) и N3a4-Z1936 (23%). В генофонде манси резко преобладает «западная» ветвь N2-Y3195 (69%). В многомерном генетическом пространстве манси тяготеют к популяциям Урало-Поволжья. Ханты по базовой панели Y-гаплогрупп сближаются с популяциями Западной и Южной Сибири. Анализ ветвей N3a4 показал, что ханты занимают промежуточное положение между «уральским» и «сибирским» кластерами: при движении предков хантов из Приуралья на северо-восток они включили оба генетических компонента. Геногеографические карты 10 ветвей гаплогруппы N3a4 в популяциях Урала и Западной Сибири отражают динамику генофонда в период от 4 до 2 тыс. лет назад.

Ключевые слова: ханты, манси, генофонд, Y-хромосома, SNP, гаплогруппа, N3a4-Z1936, N2-Y3195, N2-VL67

Финансирование: государственное задание Министерства науки и высшего образования РФ для Медико-генетического научного центра имени академика Н. П. Бочкова

Благодарности: авторы благодарят всех участников экспедиционного обследования (доноров образцов) и АНО «Биобанк Северной Евразии» (за предоставление коллекций ДНК).

Вклад авторов: Е. В. Балановская — руководство; А. Т. Агджоян — участник экспедиционного обследования обских угров; Г. Ю. Пономарёв — генотипирование Y-SNP маркеров; Г. Ю. Пономарёв, А. Ю. Потанина, Д. С. Адамов — статистический и картографический анализ, оформление статьи; Е. В. Балановская, Г. Ю. Пономарёв — дизайн исследования и написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Медико-генетического научного центра имени Н. П. Бочкова (протокол № 1 от 29 июня 2020 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Георгий Юрьевич Пономарёв
ул. Москворечье, д. 1, 115522, г. Москва, Россия; st26i900@gmail.com

Статья получена: 09.09.2024 **Статья принята к печати:** 01.10.2024 **Опубликована онлайн:** 28.10.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.044

GENETIC PORTRAITS OF KHANTY AND MANSI BASED ON THE Y CHROMOSOME HAPLOGROUPS IN THE CONTEXT OF GENE POOLS OF RUSSIA

Ponomarev GYu ✉, Agdzhoyan AT, Potanina AYu, Adamov DS, Balanovska EV

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

Khanty and Mansi are small indigenous peoples of Western Siberia with the unique cultural, anthropological, and linguistic characteristics. The study of their gene pool will make it possible to reconstruct the genetic structure of the Ugric-speaking population, of which in modern times only Khanty and Mansi remain, along with Hungarians, in whose gene pool there are traces of medieval migration of the Ugric-speaking Magyars. The detailed characterization of the gene pool of Khanty and Mansi is important for reconstruction of Ugric populations and genetic history of the region. The study was aimed to assess representative samples of Khants ($n = 83$) and Mansi ($n = 74$) based on the standard panel of 60 SNP markers and the extended panel of 74 Y-chromosomal SNP markers by statistical and cartographic methods in the context of indigenous population of Urals and Western Siberia. The differences between the gene pools of Khanty and Mansi have been revealed based on both standard panel of Y chromosome haplogroups and branches of haplogroups N2 and N3a4. Most of the Khanty gene pool is evenly distributed between N2-Y3195 (26%), N2-VL67 (23%), and N3a4-Z1936 (23%). The “Western” branch N2-Y3195 predominates in the Mansi gene pool (69%). Mansi gravitate towards populations of the Urals-Volga region in the multidimensional genetic space. Based on the standard panel of Y haplogroups, Khanty are close to the populations of Western and South Siberia. However, the analysis of branches N3a4 has shown that Khanty are intermediate between the “Uralic” and “Siberian” clusters: when the ancestors of Khanty moved from the Ural region to the northeast, these acquired both genetic components. The gene geographic maps of 10 haplogroup N3a4 branches in the populations of Urals and Western Siberia reflect the dynamic changes of the gene pool that took place 4–2 kyr.

Keywords: Khanty, Mansi, gene pool, Y-chromosome, SNP, haplogroup, N3a4-Z1936, N2-Y3195, N2-VL67

Funding: State Assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the Research Centre for Medical Genetics.

Acknowledgements: the authors would like to thank all participants of the expedition survey (donors of samples) and Biobank of North Eurasia for access to DNA collections.

Author contribution: Balanovska EV — management; Agdzhoyan AT — contribution to the expedition survey of Ob Ugrians; Ponomarev GYu — Y-SNP marker genotyping; Ponomarev GYu, Potanina AYu, Adamov DS — statistical and cartographic analysis, manuscript formatting; Balanovska EV, Ponomarev GYu — study design and manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Centre for Medical Genetics (protocol No. 1 dated 29 June 2020).

✉ **Correspondence should be addressed:** Georgy Yu. Ponomarev
Moskvorechie, 1, 115522, Moscow, Russia; st26i900@gmail.com

Received: 09.09.2024 **Accepted:** 01.10.2024 **Published online:** 28.10.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.044

Большинство представителей обских угров — ханты и манси — проживают в Ханты-Мансийском автономном округе Югра Тюменской области (далее ХМАО). Согласно переписи 2010 г., численность манси составляет 11 614 человек, хантов — 29 277 человек. Они говорят на языках угорской ветви уральской языковой семьи. Из современных народов на них говорят еще только венгры, унаследовавшие незначительный генетический след от средневековых мадьяр [1]. Обские угры обладают уникальным комплексом антропологических признаков, выделяемых в отдельную «уральскую расу» [2], а их культура включает два компонента: древний северный охотничий таежный (унаследованный от автохтонного населения) и южный скотоводческий (связанный с миграцией населения, говорившего на индиранских языках) [3]. Популяционная структура обских угров формировалась в I тыс. н. э. по обе стороны Уральских гор — от Прикамья до бассейна Оби. С XIV–XV вв. их ареал постепенно сокращался и смещался на восток под давлением коми, мигрировавших из-за экспансии русского населения.

У манси выделялись четыре этнографические группы, которые отличались высоким уровнем эндогамии: в XVIII–XIX вв. доля эндогамных браков в них составляла в среднем более 80%. Позднее часть южных манси была ассимилирована татарами и русскими, а западные манси влились в северную и восточную группы манси. Наиболее многочисленная северная группа манси включила в себя популяции западных и южных манси, а также хантов; брачные контакты с ненцами добавили монголоидных черт в их генетический портрет. Восточные манси сохранили антропологический тип, близкий к финноязычным народам Урало-Поволжья [2].

У хантов диалекты трех этнографических групп настолько различались, что их приравнивали к самостоятельным языкам, а средний уровень эндогамии в них в XVIII–XIX вв. достигал 90% [2]. Культура северных хантов наиболее близка к северным манси и ненцам, восточных хантов — к селькупам. Южная группа к настоящему времени исчезла, но предполагается, что «угорский» субстрат в культуре [4, 5] и генофонде [6] заболотных сибирских татар унаследован от южных групп манси и хантов.

В Y-генофонде обских угров выявляются оба генетических компонента — западноевразийский и восточноевразийский [1, 7–14], причем преобладает восточный (у хантов — 77%, у манси — 89%), происхождение которого связывают с верхнепалеолитической миграцией из Южной Сибири и Центральной Азии [10]. По данным мтДНК фиксируется обратный тренд: максимальная доля западноевразийского компонента (у хантов — 59%, у манси — 69%) [10]. Показана генетическая связь хантов с коми-зырянскими и самодийскими народами (энцами, тундровыми и лесными ненцами, нганасанами) на фоне генетических отличий обских угров от большинства народов Сибири (алтайцы, буряты, кеты, селькупы, эвенки, долгане, якуты) и Центральной Азии [15].

В исследовании филогенетики гаплогруппы N и моделей экспансии ее носителей данные об обских уграх представлены лишь по сумме гаплогрупп N2 и N3 [9] (по номенклатуре гаплогруппы N, введенной в исследованиях [12]). Позднее было показано, что в Западной Сибири частота гаплогруппы N2 с севера на юг убывает, а гаплогруппы N3, напротив, возрастает [12]. Анализ субвариантов N3a4 в генофонде венгров [1, 12] позволил установить, что предки обских угров и мадьяр разделились около 2700–2900 лет назад.

У хантов, возможно, сохраняются значительные генетические различия между этнографическими группами: если в северной группе частоты N2 и N3 равны (по 38%) [7], то в южной частота N3 почти в 2 раза выше (64%) [10], хотя эти различия могут быть связаны с малыми выборками: $n = 47$ в северной и $n = 28$ в южной группах.

Недавно проведенное исследование генофонда хантов и манси по базовой панели 60 маркеров Y-хромосомы указало на наличие трех компонентов в генофонде обских угров: сибирского, уральского и североευропейского [16]. Преобладает сибирский компонент (80%), в котором доминирует гаплогруппа N2, а второе место делят N3a4 (североευропейский компонент) и N3a1 (уральский). Выявленные различия между генофондами манси и хантов [16] могут отражать в себе разные аспекты генетической истории угров и требуют более детального анализа.

В данном исследовании мы значительно расширили спектр изучаемых популяций и уровень генотипирования, максимальное внимание уделив геногеографии разных вариантов гаплогрупп N2 и N3a4. Доминирующая у обских угров N2 распространена от Поволжья до Дальнего Востока, и анализ генетического ландшафта разных ветвей этой гаплогруппы может дать новую информацию о генетической истории угров. Не менее важна гаплогруппа N3a4, частота которой у обских угров выше, чем у большинства других популяций Урала и Сибири. Хотя современный ареал N3a4 сосредоточен на севере Восточно-Европейской равнины, ее происхождение связывают с Западной Сибирью [1, 11, 12]. Поэтому создание подробных генетических портретов обских угров в контексте широкого ряда окружающих популяций необходимо для понимания генетической истории обширного массива коренных народов России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Популяционные выборки хантов ($n = 83$) и манси ($n = 74$) изучены в рамках экспедиционного обследования по проекту РФФИ № 16-06-00303а при участии Биобанка Северной Евразии и охватили обширный спектр локальных популяций (рис. 1). Несмотря на наблюдаемые генетические различия между локальными группами хантов (рис. 1), для целей данного исследования мы объединили их в одну выборку на основании общей этнической принадлежности и культурной идентичности. Такое объединение позволяет провести статистический анализ, отражающий генетические характеристики хантов как единой этнической популяции. В исследование включены только неродственные мужчины (минимум до третьего поколения), чьи отцы и деды родились в изучаемых популяциях данного этноса. Данные о группах сравнения предоставлены Биобанком Северной Евразии.

Выделение ДНК из образцов венозной крови проводили на автоматической станции для выделения и очистки нуклеиновых кислот Qiagen QIASymphony SP, генотипирование — методом OpenArray на амплификаторе QuantStudio 12 Flex (Thermo Fisher Scientific; США). Базовый анализ провели по 60 SNP-маркерам Y-хромосомы, наиболее характерным для народонаселения Северной Евразии: D-M174, E-M35, E-M78, C-M217, C-F3791, C-F5481, C-F3918, C-M48, C-SK1066, C-M407, G-M201, G1-M285, G2-P15, G2-FGC595, G2-M406, G2-P303, H-M69, I-M170, I-M253, I-P37.2, I-M223, J1-M267, J1-P58, J2-M172, J2-M12, J2-M67, J2-M9, L-M20, L-M317, T-M70, N-M231, N-M128, N2-Y3205, N-M178, N3a1-B211, N3a2-M2118,

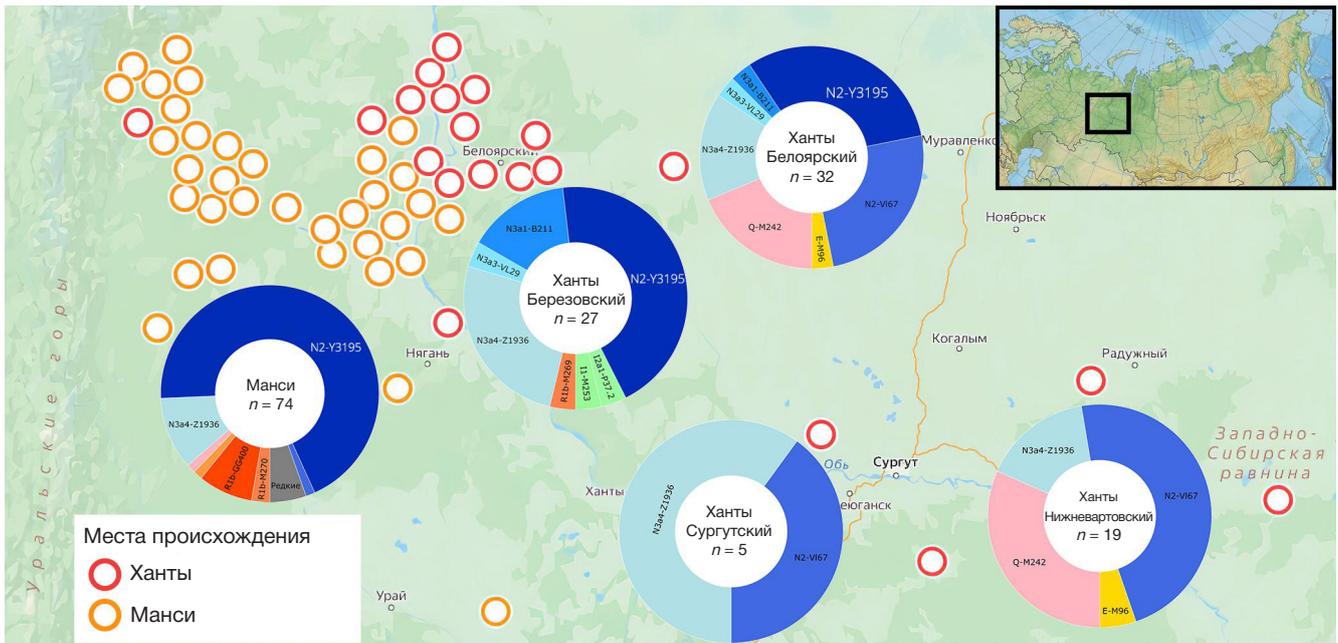


Рис. 1. Состав генофондов и карта мест происхождения образцов манси и разных групп хантов. Северные манси обследованы в Берёзовском районе ХМАО и его окрестностях вдоль рек Сосьва и Ляпин (предки по прямой мужской линии родились в поселениях Берёзово, Сосьва, Ванзетур, Карым, Кимкьясуй, Ломбовож, Верхние, Новинская, Няксимволь, Саранпауль, Хулимсунт, Патрасуй, Рахтынья, Сартынья, Ханглытур, Щекурья, Ясунт, Уньюган, а также в местах мансийских стойбищ). Ханты обследованы в Белоярском (n = 32), Берёзовском (n = 27), Сургутском (n = 5) и Нижневартовском (n = 19) районах ХМАО

N3a3-CTS10760, N3a4-Z1936, N3a5a-F4205, N-B202, N-B479, O-P186, O-M119, O-P31, O-M122, O-P201, O-M134, Q-M242, R1a-M198, R1a-PF6202, R1a-Y2395, R1a-CTS1211, R1a-Z92, R1a-Z93, R1b-M343, R1b-Y13887, R1b-M269, R1b-L51, R1b-Z2105, R2-M124.

Специально для данного исследования образцы дополнительно генотипировали еще по 14 ветвям: гаплогруппы N2 (Y3195, VL67) и N3a4 (CTS1223, Y13850, Y24370, Y24360, L1034, L1442, Y28540, Y28544, Z1924, YP5259, Z35275, Z1928).

Генетические связи и датировки происхождения гаплогрупп были приведены по древу Y-хромосомы ресурса YFull [17], если не указано иначе. Эволюционный возраст ветвей основан на анализе TMRCA (время от последнего общего предка до современности) с предоставлением 95%-х доверительных интервалов (CI, Confidence Interval). Статистический анализ проводили с помощью Statistica 7.0 (StatSoft; США), генетические расстояния Нея рассчитывали в Dajenetic [18]. Геногеографические карты создавали в оригинальной программе GeneGeo [19] методом обратных взвешенных расстояний Шепарда со степенью весовой функции K = 2 и радиусом влияния 1100 км.

Для картографирования гаплогруппы N2 использовали цветовую шкалу с максимумом 60% частоты, для N3a4 — с 30%. Формирование выборок для сравнительного анализа основывалось на цели изучения генетической структуры хантов и манси в широком масштабе Западной Сибири и Уральского региона. В связи с этим определение степени

градации каждой популяции было продиктовано сочетанием факторов обширности ареала популяции и ее гетерогенности, поскольку для построения детальных и достоверных карт распространения гаплогрупп необходимо обеспечить максимальное географическое покрытие. Данные Биобанка Северной Евразии дополнены информацией из ранее опубликованных работ [1, 11–14, 20–23].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетические портреты обских угров в контексте окружающих их народов

В генофондах обских угров выявлено 13 вариантов гаплогрупп Y-хромосомы (табл. 1, рис. 1, 2), которые показывают, что генофонды хантов и манси, несмотря на географическую и лингвистическую близость, весьма различны. Хотя в обеих популяциях преобладает гаплогруппа N2, у манси ее частота значительно выше (70%), чем у хантов (49%); а частота N3a4 в два раза выше у хантов (23%) по сравнению с манси (11%). Редкие гаплогруппы представлены у манси и хантов в разных пропорциях. Особо стоит отметить повышение у хантов частоты Q (14%), а у манси — R1b (11%).

Преобладающие в генетических портретах обских угров гаплогруппы N2 и N3a широко распространены в коренном народонаселении Приуралья и Западной Сибири (рис. 2): они доминируют во многих популяциях региона,

Таблица 1. Частоты (в %) гаплогрупп Y-хромосомы в генофондах хантов и манси

Популяция	Размер выборки	C-M217 (xM48, M407)	E-M96	I1-M253	I2a1-P37.2	N2		N3a1-B211	N3a3-VL29	N3a4-Z1936	Q-M242	R1a-M198 (xM458, Z93)	R1b	
						Y3195	VI67						GG400	M269(xGG400)
Манси	74	1,35	0	1,35	1,35	68,92	1,35	1,35	0	10,81	1,35	1,35	8,11	2,7
Ханты	83	0	2,38	1,19	1,19	26,19	22,62	5,95	2,38	22,62	14,29	0	1,19	0

Примечание: красно-розовыми оттенками отмечен градиент от наименьших частот к наибольшим: чем интенсивнее окраска ячейки, тем выше частота

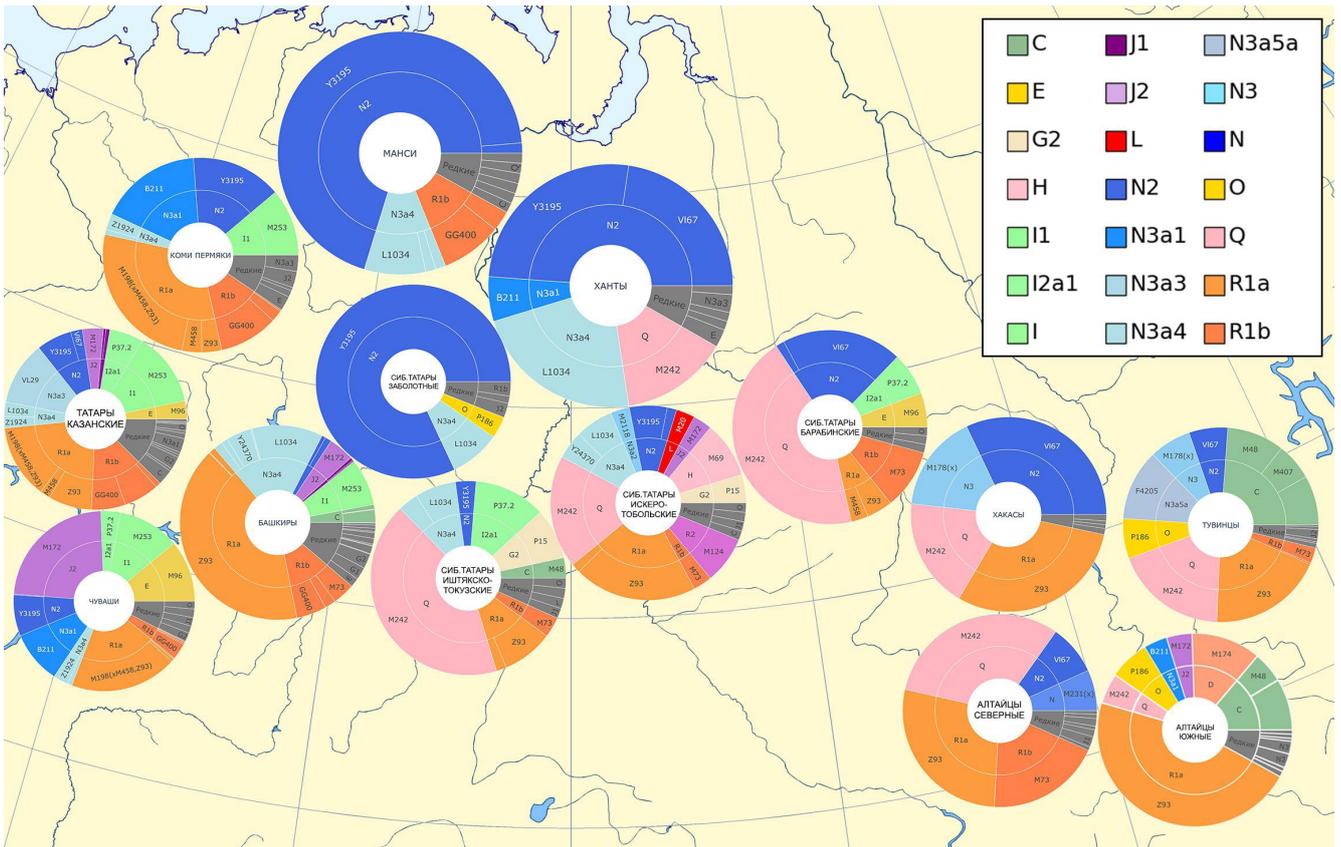


Рис. 2. Генетические портреты обских угров и окружающих коренных народов Приуралья и Западной Сибири. Во внутреннем кольце указано название гаплогруппы, во внешнем кольце — маркеры, ее определяющие; разделение секторов внешних колец отражает частоту встречаемости субгаплогруппы в популяции. В легенде указан цвет каждой гаплогруппы Y-хромосомы

свидетельствуя о схожих исторических процессах и миграционных путях.

Паттерн с доминированием гаплогруппы N2 и значительным присутствием N3a4, характерный для обских угров и многих коренных народов региона, указывает на значимость восточноевразийского генетического компонента в их генофондах и, возможно, отражает древние миграционные волны из Сибири или Центральной Азии.

Своеобразие генофонда манси проявляется в высокой частоте гаплогруппы R1b (11%), а именно ее ветви GG400 (8%). Наиболее близким к генетическому портрету манси оказываются заболотные сибирские татары, отличающиеся от них лишь наличием восточноазиатской гаплогруппы O. Среди приуральских популяций к манси наиболее близки коми-пермяки, но у них более значительное западноевразийское влияние отражено в увеличении частот R1a, N3a1 и I1.

Особенностью генофонда хантов, помимо высокой доли гаплогрупп N2 и N3a4, является высокая частота гаплогруппы Q, отражающей значительное восточноевразийское влияние. Гаплогруппа Q присутствует у алтайцев, хакасов, тувинцев, у большинства групп сибирских татар и может отражать генетические связи обских угров с населением, мигрировавшим из Центральной и Восточной Азии.

Геногеография гаплогрупп N2 и N3a4

Для ветвей гаплогрупп N2 и N3a4, наиболее характерных для обских угров, проведен картографический анализ (рис. 3, 4). Он позволяет выявлять пространственные закономерности даже при неполноте данных о частотах

Y-хромосомы в окружающих популяциях, что позволяет включить в опубликованные данные о гаплогруппах N2 и N3a4. Несмотря на разную историю происхождения, эти гаплогруппы «современники»: они возникли около 4,5 (5,1–3,8) тыс. лет назад и начали филогенетический рост.

Гаплогруппа N2 разделяется на западную ветвь Y3195 (рис. 3А) и восточную ветвь VL67 (рис. 3Б). Восточная ветвь достигает высокой частоты у восточных хантов (60%) и гыданских ненцев (72%) Тазовского района Ямало-Ненецкого автономного округа, сохранивших традиционную социальную структуру [14]. Наши результаты свидетельствуют об ином диапазоне частот: максимальная частота VL67 (42%) характерна для тофаларов, второе место делят ханты и хакасы (22%). Однако при выделении восточных хантов (Сургутского и Нижневартовского районов) частота VL67 повышается до 43%, а в нашей небольшой выборке лесных ненцев достигает 61%.

У манси, напротив, восточная ветвь N2 обнаружена с минимальной частотой (1%), а все разнообразие N2 представлено западной ветвью Y3195 (69%). Максимальной частоты она достигает у заболотных сибирских татар (81%), а со средними частотами распространена у марийцев (32%), хантов (26%), удмуртов (17%) и коми-пермяков (14%).

Распределение обеих ветвей имеет четко выраженную географическую корреляцию и общую область пересечения на территории бассейнов рек Обь и Иртыш.

Гаплогруппа N3a4 представлена двумя основными ветвями Y13850 и Z1924 в наиболее важном для генетической истории ареале Западной Сибири и Приуралья: на древе гаплогруппы N3a4 (рис. 4) ветвь Y13850 обозначена синим фоном, ветвь Z1924 —

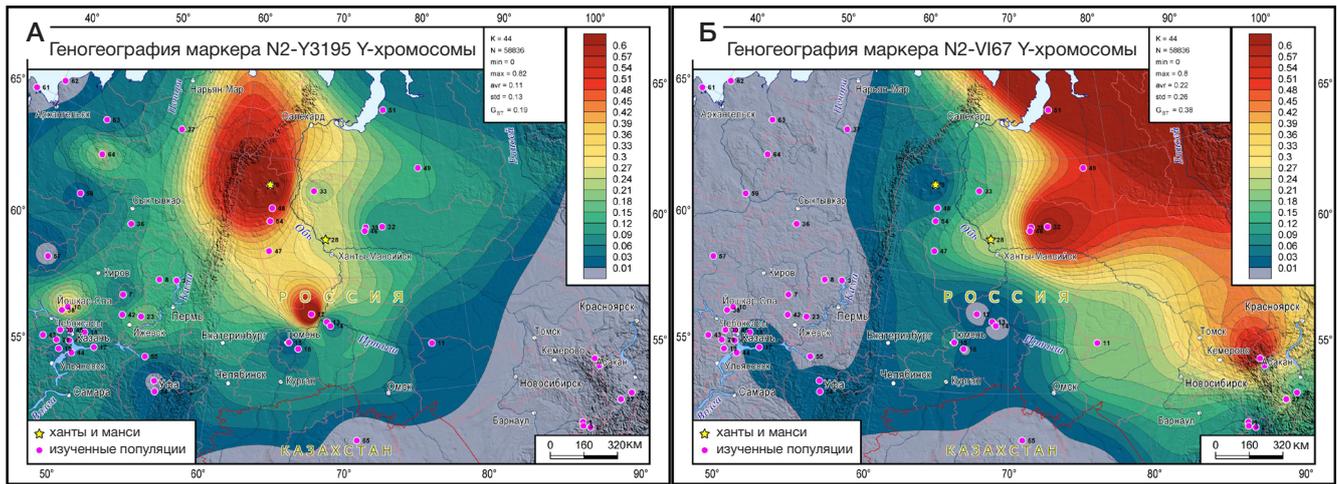


Рис. 3. Геногеография основных ветвей гаплогруппы N2 Y-хромосомы: западной ветви Y3195 гаплогруппы N2 (А) и восточной ветви VL67 гаплогруппы N2 (Б)

зеленым. Ветвь Y13850 возникла около 4,1 (4,8–3,4) тыс. лет назад [1, 14, 23] и дала начало урало-сибирскому кластеру линий Y-хромосомы. Вторая ветвь Z1924 возникла примерно в то же время (4,8–3,4 тыс. лет назад) и распространилась в западных регионах Северной Евразии, встречаясь с невысокой частотой в Приуралье, где ареалы обеих ветвей (Y13850 и Z1924) пересекаются. В изученных нами популяциях обских угров основная масса образцов относится к большому урало-сибирскому кластеру Y13850. Исключение составляет лишь один образец манси с маркером Z35275, относящимся к западному кластеру Z1924 (рис. 4).

Основная ветвь Y13850 (рис. 5А) важна как связующая нить между народами угорской языковой семьи — обскими уграми и средневековыми мадьярами (одними из предков венгров) [11, 13]. В генофонде обских угров линия Y13850 достигает частоты 23% у хантов и 8% у манси. Она делится на две субветви: Y24370 (не обнаружена у обских угров) и L1034, к которой относятся почти все изученные образцы хантов и манси с гаплогруппой N3a4 (рис. 5Б). Субветвь L1034 также дает начало двум дочерним линиям: L1442 (не обнаружена у обских угров) и Y28540, которая возникла 3,6 (4,5–2,7) тыс. лет назад, полностью включила в себя всех носителей N3a4 среди хантов (23%) и большую часть



Рис. 4. Филогенетическая структура урало-сибирского кластера N3a4 и частота встречаемости отдельных линий в популяциях хантов и манси. Числа под наименованием ветвей показывают их датировки в тысячах лет назад (ка); 95%-е доверительные интервалы приведены в тексте

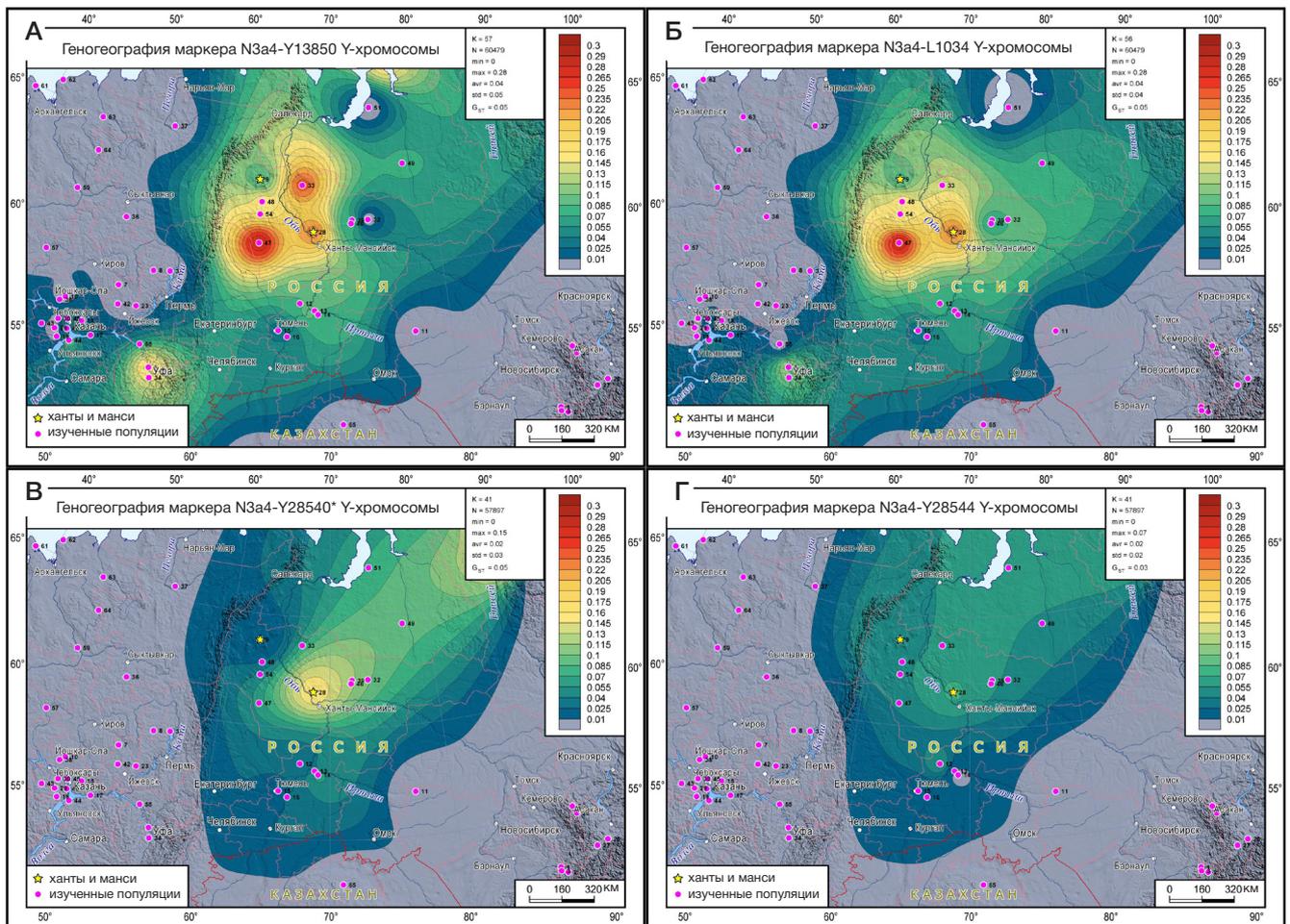


Рис. 5. Географическое распространение и частота встречаемости субветвей гаплогруппы N3a4. А. Геогеография ветви Y13850 гаплогруппы N3a4. Б. Геогеография ветви L1034 гаплогруппы N3a4. В. Геогеография ветви Y28540* гаплогруппы N3a4. Г. Геогеография ветви Y28544 гаплогруппы N3a4

манси (7%). Ветвь Y28540 вновь делится на два варианта (рис. 4): дочерняя Y28544 (рис. 5Г) возникла 2,9 (3,9–2,1) тыс. лет назад и примерно с равной частотой встречается у хантов и манси; а непосредственно корневой вариант Y28540(xY28544) (рис. 5В) преобладает у хантов (15%) и редок у манси (1%).

За высокой частотой корневого варианта у хантов, скорее всего, скрываются несколько дочерних линий, обнаружить которые позволит полногеномное секвенирование. Вероятнее всего, обе ветви (Y28544 и прикорневая Y28540(xY28544)) унаследованы хантами и манси от общих предков, но ханты сохранили высокую частоту корневого варианта благодаря большей численности и обширности ареала расселения разных эндогамных этнографических групп.

Картографирование ветви L1034 демонстрирует ее широкое распространение в Западной Сибири и Урало-Поволжье, а также два всплеска частоты. Один максимум L1034 наблюдается у хантов данного исследования (~23% частоты), а второй — у южных манси (~27% частоты), впервые опубликованных в работе [13] и упоминающихся в других работах [1, 24]. Столь высокие значения у южных манси резко отличаются как от нашей выборки северных манси (8%), представленной в данном исследовании, так и от выборки [11] (15%). Различия по частоте ветви L1034 между географически отдаленными субпопуляциями внутри хантов и манси могут быть объяснены влиянием генетического дрейфа и малым объемом выборки, в итоге сместившими соотношения частот гаплогрупп.

Положение обских угров в генетическом пространстве коренных народов России

Анализ положения угров в генетическом пространстве методом многомерного шкалирования проведен дважды: 1) по стандартной панели из 38 Y-SNP-маркеров, позволившей включить опубликованные данные о ненцах и восточных хантах [14, 23] (табл. 2, рис. 6А); 2) анализ популяции нашего коллектива по расширенной панели 48 Y-SNP-маркеров (табл. 2, рис. 6Б), которая дополнительно включила 10 субветвей гаплогруппы N3a4, играющих ключевую роль в разделении генетических ландшафтов Сибири и Европы. Анализ, впервые проведенный на столь детализированном уровне, позволяет проследить динамику генофонда во времени. Анализ по стандартной панели 38 Y-SNP-маркеров учитывает паттерн генетических связей, которые начали формироваться ранее 4 тыс. лет назад (до подразделения гаплогруппы N3a4 на субветви). Анализ по панели 48 Y-SNP-маркеров, расширенной за счет субтипирования гаплогруппы N3a4, отражает особенности населения изучаемой территории в более поздний период.

Анализ по стандартной панели 38 Y-SNP-маркеров. График многомерного шкалирования по стандартной панели выявил два кластера популяций (рис. 6А). Уральский кластер включил финно-угорские и тюркские популяции Уральского региона; к этому кластеру близки манси вместе с заболотными сибирскими татарами. Сибирский кластер включил, кроме тюркоязычных народов Сибири,

Таблица 2. Паттерн генетических расстояний от обских угров до окружающих народов России

Панель генотипирования		Стандартная панель			Расширенная панель		
Этносы и субэтноты	Размер выборки (чел.)	38 SNP			48 SNP		
		Манси	Ханты	Обские угры	Манси	Ханты	Обские угры
Манси	74	0,00	0,41	0,05	0,00	0,41	0,05
Сибирские татары заболотные	83	0,01	0,45	0,07	0,01	0,43	0,06
Обские угры	157	0,05	0,14	0,00	0,05	0,15	0,00
Марийцы	316	0,26	0,61	0,29	0,25	0,54	0,27
Ханты	84	0,41	0,00	0,14	0,41	0,00	0,15
Коми-пермяки	367	0,79	1,15	0,83	0,79	1,09	0,81
Татары казанские	432	1,20	1,24	1,13	1,25	1,35	1,20
Удмурты	260	1,22	1,23	1,14	1,22	1,17	1,12
Сибирские татары искеро-тобольские	64	1,47	0,74	1,04	1,58	0,95	1,21
Чуваши Татарстана	80	1,47	1,57	1,42	1,49	1,50	1,41
Чуваши Чувашии	419	1,52	1,90	1,57	1,52	1,84	1,54
Татары мишари	158	1,84	2,03	1,82	1,85	1,97	1,81
Татары кряшены	66	1,91	2,06	1,88	1,91	2,00	1,85
Бесермяне	49	2,00	1,53	1,70	1,99	1,47	1,68
Сибирские татары иштякско-токузские	59	2,18	0,88	1,38	2,32	0,88	1,44
Башкиры	943	2,57	1,54	1,95	3,31	3,20	3,18
Сибирские татары ялutorовские	77	2,57	2,12	2,28	2,66	2,24	2,40
Сибирские татары барабинские	70	2,90	0,68	1,38	2,90	0,62	1,36
Тоджинцы	69	3,88	1,16	1,92	3,87	1,10	1,90
Сибирские татары тюменские	59	3,90	1,97	2,62	4,21	2,04	2,76
Тофалары	42	3,91	0,89	1,68	3,91	0,83	1,65
Хакасы	178	3,92	0,82	1,61	3,93	0,76	1,59
Тувинцы	390	3,95	1,31	2,06	3,95	1,25	2,04
Алтайцы северные	161	4,02	1,18	1,95	4,03	1,12	1,93
Алтайцы южные	175	4,63	2,67	3,33	4,63	2,61	3,30
Ханты Казыма [14]	54	0,72	0,15	0,37	–	–	–
Ханты Русскинская [14]	64	1,85	0,56	1,06	–	–	–
Ненцы гыданские [23]	322	2,23	0,43	1,06	–	–	–

все популяции хантов и ненцев. Популяции Южной Сибири (тоджинцы, тофалары, тувинцы, хакасы) генетически близки к хантам и значительно отличаются от манси (рис. 6А, табл. 2). «Географический принцип» нарушают популяции ялutorовских сибирских татар, тяготеющих к Уральскому кластеру, и башкиры, максимально близко подошедшие к Сибирскому кластеру.

Анализ по расширенной панели 48 Y-SNP-маркеров. Положение обских угров в генетическом пространстве уточняется при сравнении графиков многомерного шкалирования (рис. 6А и рис. 6Б) благодаря делению информативной гаплогруппы N3a4 на субветви. Очевидно, что Сибирский и Уральский кластеры приобретают более четкие различия и дальше расходятся друг от друга в генетическом пространстве. При этом ханты выходят из Сибирского кластера и приближаются к

Уральскому. Башкиры, напротив, еще больше удаляются и от Уральского кластера, и от хантов: при переходе к расширенной панели их генетические расстояния от хантов возрастают в два раза: от $d = 1,5$ до $d = 3,2$ (табл. 2) благодаря весоному вкладу гаплогруппы N3a4 в их генофонд. Манси вместе с заболотными сибирскими татарами, хантами и финноязычными популяциями Приуралья (марийцами, $d = 0,2$; коми-пермяками, $d = 0,8$; удмуртами, $d = 1,2$) образуют новый Протоуральский кластер (рис. 6Б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В продолжение исследования угорских народов нами значительно уточнены и расширены выводы, сделанные в предыдущей публикации [16].

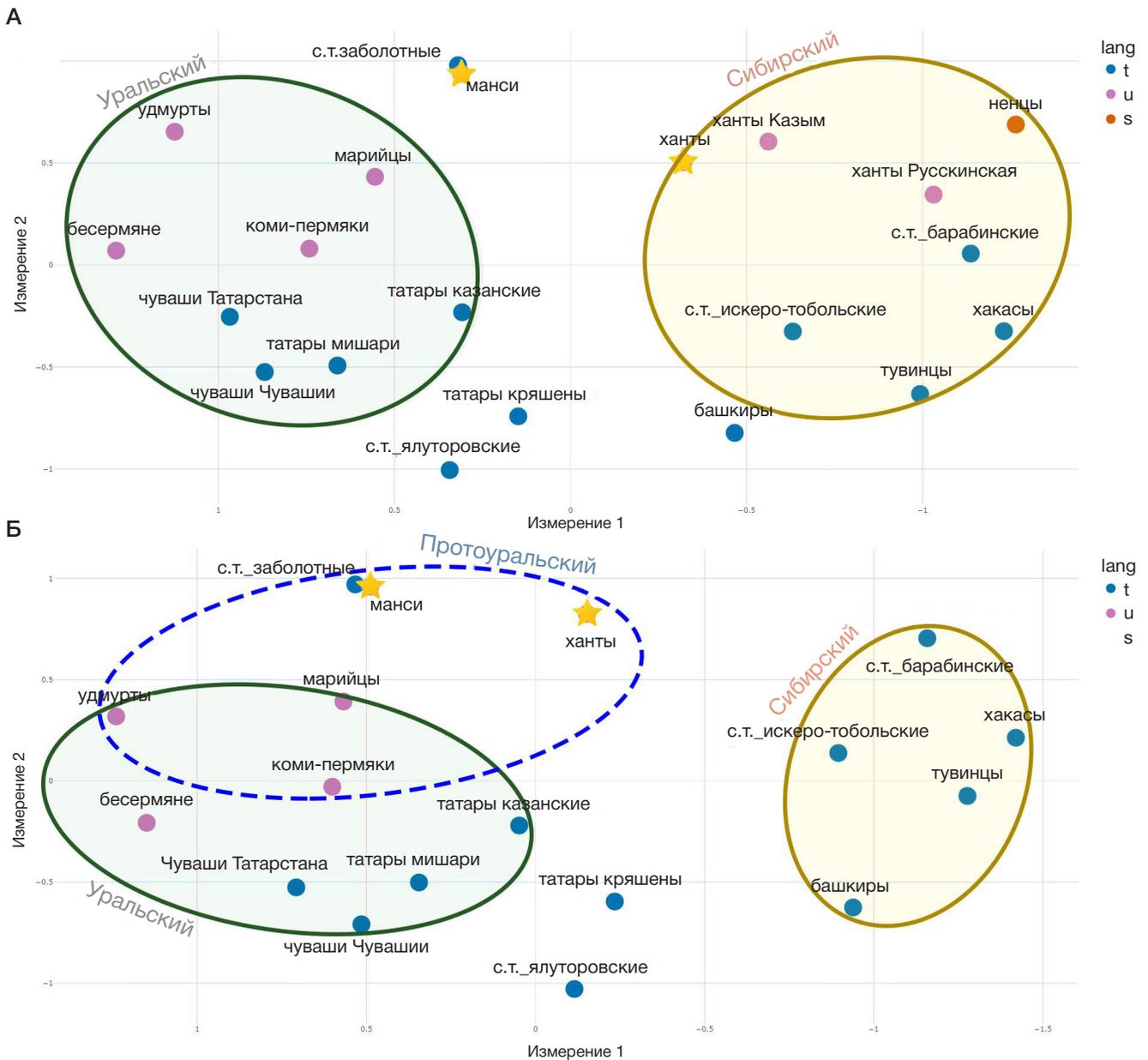


Рис. 6. Положение обских угров в генетическом пространстве окружающих народов России. **А.** График многомерного шкалирования по стандартной панели 38 маркеров Y-хромосомы (коэффициент стресса = 0,14; коэффициент алиенации = 0,16). **Б.** График многомерного шкалирования по расширенной панели 48 маркеров Y-хромосомы (коэффициент стресса = 0,16; коэффициент алиенации = 0,17). Розовым цветом обозначены народы, говорящие на языках уральской лингвистической семьи (u); синим цветом — принадлежность к тюркской ветви алтайской языковой семьи (t)

Дополнительный анализ субветвей N2 и N3a4 и положения обских угров в генетическом пространстве по расширенной панели маркеров Y-хромосомы подтвердил доминирующее влияние восточноевразийского компонента на их генофонды. Однако геогеография ветвей N2 выявила значительные различия: у хантов восточная V167 и западная Y3195 ветви представлены примерно с равными частотами (около четверти генофонда каждая); у манси западная ветвь составляет уже две трети всего их Y-генофонда, а восточная ветвь практически отсутствует. С учетом истории миграций мансийского населения это может указывать, что в период формирования субветвей N2 протомансийские популяции находились намного западнее современного ареала, и поэтому влияние восточноевразийского компонента мало. Это подтверждает и положение манси в генетическом пространстве: наиболее генетически близки к ним финно-угорские народы Поволжья.

Реконструкция генетической истории хантов выглядит проблематичнее. Учитывая широкий ареал распространения и равный вклад восточноевразийского и уральского компонентов, можно предложить несколько гипотез о формировании их генофонда. Возможно, предки хантов первоначально проживали на территории Приуралья и при продвижении на северо-восток ассимилировали местное население, в генофонде которых значительный вес имела гаплогруппа Q. Такая гипотеза основана на равном вкладе обеих ветвей N2 и высокой частоте восточной ветви N2 у северных и восточных хантов, а также повышении частоты N3a4. График многомерного шкалирования подтверждает данную гипотезу, демонстрируя сближение хантов с народами финно-угорского Поволжья именно за счет вклада гаплогруппы N3a4 у хантов. Согласно другой гипотезе, протохантыйские популяции изначально обладали и обеими ветвями N2, и уральским кластером N3a4, и сибирской гаплогруппой Q.

Эта гипотеза основана на том, что разные группы хантов имеют схожий спектр доминирующих гаплогрупп несмотря на широкий этнографический ареал.

Однозначно можно сказать, что генетические связи обских угров, обусловленные гаплогруппой N3a4, имеют давнее происхождение и важны для реконструкции генофонда угров наравне с ветвями гаплогруппы N2. Таким образом, наше исследование впервые демонстрирует, как филогенетическая структура гаплогрупп N3a4 и N2 четко разделяет генофонды Сибири и Европы, что является важным шагом в понимании популяционной истории региона.

ВЫВОДЫ

Осуществлен комплексный анализ генофондов хантов и манси по широкому спектру гаплогрупп Y-хромосомы в

контексте коренного народонаселения Западной Сибири и Урала. Подробное изучение филогенетической структуры восточного кластера гаплогруппы N3a4 позволило уточнить временные рамки и направления миграционных процессов в регионе. Определено положение обских угров среди коренных народов Сибири и Урала: манси генетически близки к популяциям Урало-Поволжья; ханты занимают промежуточное положение между уральским и сибирским кластерами, что отражает сложные исторические взаимодействия и смешение генетических компонентов. Таким образом, цель исследования успешно достигнута; полученные результаты расширяют понимание генетической истории обских угров и подчеркивают значимость детального анализа субветвей гаплогрупп Y-хромосомы для реконструкции исторических процессов в регионе.

Литература

- Post H, Németh E, Klima L, Flores R, Fehér T, Türk A, et al. Y-chromosomal connection between Hungarians and geographically distant populations of the Ural Mountain region and West Siberia. *Scientific Reports*. 2019; 9 (1): 7786.
- Гемуев И. Н. и др., редакторы. Народы Западной Сибири: Ханты. Манси. Селькупы. Ненцы. Эңцы. Нганасаны. Кеты. М.: Наука, 2005; 804 с.
- Соколова З. П. Ханты и манси. Взгляд из XXI века. М.: Наука, 2009; 755 с.
- Томилов Н. А. Тюркоязычное население Западно-Сибирской равнины в конце XVI первой четверти XIX вв. Изд-во ТГУ. Томск, 1981; 276 с.
- Бакиева Г. Т., Квашнин Ю. Н. Тюрки, самодийцы и угры в Тобольском Прииртыше (к вопросу об этногенезе заболотных татар). Больше, чем этнограф. Сборник научных статей, посвященных памяти профессора В. В. Пименова. М.: Изд-во МГУ, 2015.
- Агджоян А. Т., Балановская Е. В., Падукова А. Д., Долинина Д. О., Кузнецова М. А., Запорожченко В. В. и др. Генофонд сибирских татар: пять субэтносов — пять путей этногенеза. *Молекулярная биология*. 2016; 50 (6): 978–91.
- Karafet TM, Osipova LP, Gubina MA, Posukh OL, Zegura SL, Hammer MF. High Levels of Y-Chromosome Differentiation among Native Siberian Populations and the Genetic Signature of a Boreal Hunter-Gatherer Way of Life. *Human Biology*. 2002; 74 (6): 761–89.
- Karafet TM, Osipova LP, Savina OV, Hallmark B, Hammer MF. Siberian genetic diversity reveals complex origins of the Samoyedic-speaking populations. *American Journal of Human Biology*. 2018; 30 (6): e23194.
- Rootsi S, Zhivotovsky LA, Baldovici M, Kayser M, Kutuev IA, Khusainova R, et al. A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe. *European Journal of Human Genetics*. 2007; 15 (2): 204–11.
- Pimenoff VN, Comas D, Palo JU, Verhulst G, Kozlov A, Sajantila A. Northwest Siberian Khanty and Mansi in the junction of West and East Eurasian gene pools as revealed by uniparental markers. *European Journal of Human Genetics*. 2008; 16 (10): 1254–64.
- Fehér T, Németh E, Vándor A, Kornienko IV, Csáji LK, Pamjav H. Y-SNP L1034: limited genetic link between Mansi and Hungarian-speaking populations. *Molecular Genetics and Genomics*. 2015; 290 (1): 377–86.
- Illumäe AM, Reidla M, Chukhryaeva M, Järve M, Post H, Karmin M, et al. Human Y Chromosome Haplogroup N: A Non-trivial Time-Resolved Phylogeography that Cuts across Language Families. *The American Journal of Human Genetics*. 2016; 99 (1): 163–73.
- Dudás E, Vágó-Zalán A, Vándor A, Saypasheva A, Pomozi P, Pamjav H. Genetic history of Bashkirian Mari and Southern Mansi ethnic groups in the Ural region. *Molecular Genetics and Genomics*. 2019; 294 (4): 919–30.
- Харьков В. Н., Колесников Н. А., Валихова Л. В., Зарубин А. А., Сваровская М. Г., Марусин А. В. и др. Связь генофонда хантов с народами Западной Сибири, Предуралья и Алтая-Саян по данным о полиморфизме аутосомных локусов и Y-хромосомы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023; 27 (1): 46–54.
- Karafet TM, Mendez FL, Meilerman MB, Underhill PA, Zegura SL, Hammer MF. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosome haplogroup tree. *Genome Research*. 2008; 18 (5): 830–38.
- Агджоян А. Т., Пономарёв Г. Ю., Сальникова А. Д., Лавряшина М. Б., Пылёв В. Ю., Балановская Е. В. Генофонд обских угров в контексте народонаселения северной Евразии: геогеография ветвей гаплогруппы N Y-хромосомы. *Культурное наследие народов Западной Сибири: угры*. В сборнике: Материалы IX Всероссийского симпозиума «Культурное наследие народов Западной Сибири: угры»; 8–9 декабря 2022 г.; Киров: Изд-во МЦИТО, 2023; с. 31–36.
- Tree YTree v12.03.00 (cited 31 august 2024) Available from: <https://www.yfull.com/sc/tree/>
- Balanovsky O, Rootsi S, Pshenichnov A, Kivisild T, Churnosov M, Evseeva I, et al. Two Sources of the Russian Patrilineal Heritage in Their Eurasian Context. *The American Journal of Human Genetics*. 2008; 82 (1): 236–50.
- Кошель С. М. Геоинформационные технологии в геогеографии. В книге: И. К. Лурье, В. И. Кравцова, редакторы. Современная географическая картография. М.: Дата+, 2012; с. 158–66.
- Tambets K, Yunusbayev B, Hudjashov G, Illumäe AM, Rootsi S, Honkola T, et al. Genes reveal traces of common recent demographic history for most of the Uralic-speaking populations. *Genome Biology*. 2018; 19 (1): 139.
- Triska P, Chekanov N, Stepanov V, Khusnutdinova EK, Kumar GPA, Akhmetova V, et al. Between Lake Baikal and the Baltic Sea: genomic history of the gateway to Europe. *BMC Genetics*. 2017; 18 (S1): 110.
- Wong EHM, Khrunin A, Nichols L, Pushkarev D, Khokhrin D, Verbenko D, et al. Reconstructing genetic history of Siberian and Northeastern European populations. *Genome Research*. 2017; 27 (1): 1–14.
- Харьков В. Н., Валихова Л. В., Яковлева Е. Л., Сереброва В. Н., Колесников Н. А., Петелина Т. И. и др. Реконструкция происхождения гыданских ненцев на основе генетического анализа их родовой структуры с помощью нового набора YSTR-маркеров. *Генетика*. 2021; 57 (12): 1403–14.
- Pamjav H, Dudás E, Krizsán K, Galambos A. A Y-chromosomal study of mansi population from Konda River Basin in Ural. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2019; 7 (1): 602–03.

References

1. Post H, Németh E, Klíma L, Flores R, Fehér T, Türk A, et al. Y-chromosomal connection between Hungarians and geographically distant populations of the Ural Mountain region and West Siberia. *Scientific Reports*. 2019; 9 (1): 7786.
2. Gemuev IN, i dr., redaktory. *Narody Zapadnoj Sibiri: Hanty. Mansi. Sel'kupy*. Nency. Jency. Nganasany. Kety. M.: Nauka, 2005; 804 s. Russian.
3. Sokolova ZP. *Hanty i mansi. Vzgljad iz XXI veka*. M.: Nauka, 2009; 755 s. Russian.
4. Tomilov NA. *Tjurkojazychnoe naselenie Zapadno-Sibirskoj ravniny v konce XVI pervoj chetverti XIX vv. Izd-vo TGU*. Tomsk, 1981; 276 s. Russian.
5. Bakieva GT, Kvashnin YuN. *Tjurki, samodijcy i ugray v Tobol'skom Priirtysh'e (k voprosu ob jetnogeneze zabolotnyh tatar)*. Bol'she, chem jetnograf. *Sbornik nauchnyh statej, posvjashhennyh pamjati professora V. V. Pimenova*. M.: Izd-vo MGU, 2015. Russian.
6. Agdzhoyan AT, Balanovska EV, Padyukova AD, Dolinina DO, Kuznetsova MA, Zaporozhchenko VV, et al. Gene pool of Siberian Tatars: Five ways of origin for five subethnic groups. *Molecular biology*. 2016; 50: 860–73.
7. Karafet TM, Osipova LP, Gubina MA, Posukh OL, Zegura SL, Hammer MF. High Levels of Y-Chromosome Differentiation among Native Siberian Populations and the Genetic Signature of a Boreal Hunter-Gatherer Way of Life. *Human Biology*. 2002; 74 (6): 761–89.
8. Karafet TM, Osipova LP, Savina OV, Hallmark B, Hammer MF. Siberian genetic diversity reveals complex origins of the Samoyedic-speaking populations. *American Journal of Human Biology*. 2018; 30 (6): e23194.
9. Rootsi S, Zhivotovsky LA, Baldovič M, Kayser M, Kutuev IA, Khusainova R, et al. A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe. *European Journal of Human Genetics*. 2007; 15 (2): 204–11.
10. Pimenoff VN, Comas D, Palo JU, Vershubsky G, Kozlov A, Sajantila A. Northwest Siberian Khanty and Mansi in the junction of West and East Eurasian gene pools as revealed by uniparental markers. *European Journal of Human Genetics*. 2008; 16 (10): 1254–64.
11. Fehér T, Németh E, Vándor A, Kornienko IV, Csáji LK, Pamjav H. Y-SNP L1034: limited genetic link between Mansi and Hungarian-speaking populations. *Molecular Genetics and Genomics*. 2015; 290 (1): 377–86.
12. Ilumäe AM, Reidla M, Chukhryaeva M, Järve M, Post H, Karmin M, et al. Human Y Chromosome Haplogroup N: A Non-trivial Time-Resolved Phylogeography that Cuts across Language Families. *The American Journal of Human Genetics*. 2016; 99 (1): 163–73.
13. Dudás E, Vágó-Zalán A, Vándor A, Saypashva A, Pomozi P, Pamjav H. Genetic history of Bashkirian Mari and Southern Mansi ethnic groups in the Ural region. *Molecular Genetics and Genomics*. 2019; 294 (4): 919–30.
14. Kharkov VN, Kolesnikov NA, Valikhova LV, Zarubin AA, Svarovskaya MG, Marusin AV, Khitrinskaya IY, Stepanov VA, i dr. Svjaz' genofonda hantov s narodami Zapadnoj Sibiri, Predural'ja i Altaja-Sajan po dannym o polimorfizme avtosomnyh lokusov i Y-hromosomy. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii*. 2023; 27 (1): 46–54. Russian.
15. Karafet TM, Mendez FL, Meilerman MB, Underhill PA, Zegura SL, Hammer MF. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosome haplogroup tree. *Genome Research*. 2008; 18 (5): 830–38.
16. Agdzhoyan AT, Ponomarev GYu, Salnikova AD, Lavryashina MB, Pylev VYu, Balanovskaya EV. *Genofond obskih ugrov v kontekste narodonaselenija severnoj Evrazii: genogeografija vetvej gaplogruppy N Y-hromosomy. Kul'turnoe nasledie narodov Zapadnoj Sibiri: ugray*. V sbornike: *Materialy IX Vserossijskogo simpoziuma «Kul'turnoe nasledie narodov Zapadnoj Sibiri: ugray»*; 8–9 dekabnja 2022 g.; Kirov: Izd-vo MCITO, 2023; s. 31–36. Russian.
17. Tree YTree v12.03.00 (cited 31 august 2024) Available from: <https://www.yfull.com/sc/tree/>
18. Balanovsky O, Rootsi S, Pshenichnov A, Kivisild T, Churnosov M, Evseeva I, et al. Two Sources of the Russian Patrilineal Heritage in Their Eurasian Context. *The American Journal of Human Genetics*. 2008; 82 (1): 236–50.
19. Koshel SM. *Geoinformacionnye tehnologii v genogeografii*. V knige: I. K. Lur'e, V. I. Kravcova, redaktory. *Sovremennaja geograficheskaja kartografija*. M.: Data+, 2012; s. 158–66. Russian.
20. Tambets K, Yunusbayev B, Hudjashov G, Ilumäe AM, Rootsi S, Honkola T, et al. Genes reveal traces of common recent demographic history for most of the Uralic-speaking populations. *Genome Biology*. 2018; 19 (1): 139.
21. Triska P, Chekanov N, Stepanov V, Khusnutdinova EK, Kumar GPA, Akhmetova V, et al. Between Lake Baikal and the Baltic Sea: genomic history of the gateway to Europe. *BMC Genetics*. 2017; 18 (S1): 110.
22. Wong EHM, Khrunin A, Nichols L, Pushkarev D, Khokhrin D, Verbenko D, et al. Reconstructing genetic history of Siberian and Northeastern European populations. *Genome Research*. 2017; 27 (1): 1–14.
23. Kharkov VN, Valihova LV, Yakovleva EL, Serebrova VN, Kolesnikov NA, Petelina TI, i dr. *Rekonstrukcija proishozhdenija gydanskih nencev na osnove geneticheskogo analiza ih rodovoj struktury s pomoshh'ju novogo nabora YSTR-markerov*. *Genetika*. 2021; 57 (12): 1403–14. Russian.
24. Pamjav H, Dudás E, Krizsán K, Galambos A. A Y-chromosomal study of mansi population from konda River Basin in Ural. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2019; 7 (1): 602–03.

РАЗРАБОТКА КАСТОМНЫХ БАРКОДОВ ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ПЛАТФОРМЕ MGI

А. О. Шмитко , И. А. Булушева, Ю. А. Василиадис, О. Н. Сучалко, Д. С. Сырко, В. А. Белова, А. С. Павлова, Д. О. Коростин

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

Платформа секвенирования следующего поколения MGI (MGI Tech Co. Ltd., Китай), включающая секвенаторы DNBSEQ-G50, -G400 и -T7, активно внедряется в научные исследования. Однако сохраняются ограничения, связанные с использованием стандартных баркодов, в частности, на количество одновременно секвенируемых образцов и на соотношение их количества, а также присутствует проблема совместимости баркодов из разных или неполных наборов. Целью работы было разработать универсальный метод, позволяющий секвенировать до 252 образцов одновременно на одной дорожке секвенатора, с устранением ограничений, связанных с баркодами. Мы предложили «метод четверок», обеспечивающий уравнивание баркодов по принципу 4 или 4n+2. Проведена проверка метода на соответствие требованиям к баркодам для секвенирования, а также валидация метода на платформе DNBSEQ G-400. Метод четверок показал эффективность и надежность, позволяет секвенировать до 252 образцов одновременно без снижения качества данных, он оптимизирует процесс подготовки библиотек и повышает гибкость секвенирования на платформе MGI.

Ключевые слова: кастомные баркоды, кастомные индексы, кастомные адаптеры, DNBSEQ, MGI, BGI, NGS

Финансирование: соглашение о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации на осуществление государственной поддержки создания и развития центра геномных исследований мирового уровня «Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины» № 075-15-2019-1789 от 22.11.2019.

Вклад авторов: А. О. Шмитко — планирование исследования, сбор данных, подготовка рукописи; И. А. Булушева — методология, анализ данных, подготовка рукописи; Ю. А. Василиадис, О. Н. Сучалко, Д. С. Сырко — анализ данных, программное обеспечение, визуализация; В. А. Белова — планирование исследования, рецензирование и редактирование рукописи; А. С. Павлова — курация данных, анализ данных, программное обеспечение; Д. О. Коростин — концептуализация, супервизия, методология, рецензирование и редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Анна Олеговна Шмитко
ул. Островитянова, д. 1, с. 1, г. Москва, 117997, Россия; annashmi97@gmail.com

Статья получена: 15.08.2024 **Статья принята к печати:** 17.09.2024 **Опубликована онлайн:** 10.10.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.040

DESIGNING OF CUSTOM BARCODES FOR SEQUENCING ON THE MGI PLATFORM

Shmitko AO , Bulusheva IA, Vasiliadis IA, Suchalko ON, Syrko DS, Belova VA, Pavlova AS, Korostin DO

Pirogov Russian National Research Medical University, Russia

The MGI (MGI Tech Co. Ltd., China) next-generation sequencing platform, including the DNBSEQ-G50, -G400, and -T7 sequencers, is being actively adopted in research. Despite its widespread adoption, challenges persist in the form of limitations associated with the manufacturer's provided barcode set for library preparation. These limitations include constraints on the number of samples that can be concurrently sequenced, compatibility issues with barcodes from diverse or incomplete sets, and restrictions on the sample ratio. Purpose: to develop a universal method that allows sequencing of up to 252 samples simultaneously on a single sequencer lane, while eliminating barcode-related limitations. We proposed a "quad method" that provides 4 or 4n+2 equilibration of barcodes. This paper also delves into its comprehensive analysis, verification procedures, seamless integration into the sequencing process and validation of the method on the DNBSEQ G-400 platform. The quad method showed efficiency and reliability, allowing sequencing of up to 252 samples simultaneously without compromising data quality. The proposed method optimizes library preparation and improves the flexibility of sequencing on the MGI platform.

Keywords: DNBSEQ, MGI, BGI, NGS, custom barcodes, custom indexes, custom adapters

Funding: this research was funded by the grant №075-15-2019-1789 from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation allocated to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine.

Author contribution: Shmitko AO — study planning, data collection, writing Original Draft Preparation; Bulusheva IA — methodology, data analysis, writing Original Draft Preparation; Vasiliadis IA, Suchalko ON, Syrko DS — data analysis, software, visualization; Belova VA — study planning, manuscript review and editing; Pavlova AS — data curation, data analysis, software; Korostin DO — conceptualization, supervision, methodology, manuscript review and editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna O. Shmitko
Ostrovityanova, 1/1, Moscow, 117997, Russia; annashmi97@gmail.com

Received: 15.08.2024 **Accepted:** 17.09.2024 **Published online:** 10.10.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.040

MGI Tech, основанная в 2016 г. как дочерняя компания BGI Group, является относительно новым игроком на рынке секвенирования следующего поколения (NGS) [1–3]. Первая платформа для секвенирования MGISEQ-2000 была представлена в 2017 г., за ней последовали платформы MGISEQ-200RS и MGISEQ-T7. MGI выпускает линейку секвенаторов на основе технологии наночастиц ДНК и секвенирования cPAS [4]. Секвенирование возможно в одноконцевом и парноконцевом режиме, с использованием одно- или двухбаркодных условий.

Технология предполагает баркодирование образцов на этапе лигирования адаптеров, содержащих их

последовательности. Баркодирование ДНК-библиотеки необходимо для маркирования последовательностей, принадлежащих разным биообразцам, а также для идентификации прочтений в процессе преобразования промежуточных файлов секвенирования в общепотребимый формат fastq. Длина последовательности баркода у MGI составляет 10 пар оснований.

Стандартные наборы реагентов для подготовки библиотек и секвенирования на приборе средней производительности DNBSEQ G-400 предназначены для одноиндексного секвенирования, тогда как режим двойного баркодирования является опциональным

и требует приобретения дополнительных наборов. В настоящее время MGI предлагает набор, включающий 96 баркодированных адаптеров для этапа лигирования при подготовке библиотеки ДНК для одноконцевого секвенирования. Кроме того, MGI предлагает 32 последовательности баркодов для синтеза.

Система G-400 чувствительна к балансу нуклеотидов на каждом цикле секвенирования баркода, так как качество резко падает, если одна и та же позиция в последовательностях баркодов с одной и той же дорожки занята одним и тем же нуклеотидом. По этой причине набор баркодов на одном лейне должен удовлетворять критериям комбинации их последовательностей и формировать совместимые сетки. Предлагаемый MGI набор из 96 адаптеров формирует 11 сетов (2 по 4, 8 по 8 и 1 на 24 баркода). Однако на практике возникает необходимость комбинировать образцы с баркодами из разных сетов, изменять количество образцов, загружаемых на дорожку ячейки, и их соотношение. В лабораторной практике нередко возникают ситуации, когда одна или несколько библиотек ДНК не соответствуют стандартам контроля качества на заключительном этапе. Гибкий подход к комбинированию образцов упрощает задачу объединения библиотек для загрузки на дорожку. Кроме того, необходимо учитывать задачу комбинирования образцов с разным требуемым объемом выходных данных, например экзоменов с разным покрытием $\times 200$ и $\times 100$.

Таким образом, производитель накладывает ограничения на пользователей платформы довольно небольшим набором баркодов и сетов, что не позволяет раскрыть ее истинный потенциал для секвенирования. Это может оказаться критичным при выборе платформы для секвенирования. Для Illumina разработаны индивидуальные решения для различных задач [5–7], в то время как для MGI таких решений пока нет.

Ранее мы разработали программное обеспечение, позволяющее выбрать оптимальную комбинацию предоставленных баркодов при различных соотношениях и количестве образцов для наборов адаптеров MGI [8]. Обновленное ПО, включающее пользовательские баркоды, доступно в репозитории GitHub (<https://github.com/genomecenter/BC-store/tree/custom-adapter-sets>). Для приборов Illumina для выбора сбалансированного соотношения баркодов в зависимости от задач секвенирования программы также существуют [9–11].

Цель данной работы — представить разработанный нами алгоритм, позволяющий генерировать необходимое для исследования количество последовательностей

баркодов. Используя его, мы подобрали 252 баркода, сформировав 63 сбалансированных сетов, каждый из которых состоит из 4 баркодов и позволяет комбинировать любые наборы сетов между собой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Формулировка метода и подбор баркодов

Секвенатор имеет ограничения по интенсивности регистрируемого сигнала от флуорофоров, соответствующих нуклеотидам. Если в одной и той же позиции баркодов содержится одинаковый нуклеотид, то качество прочтения значительно снижается, что приводит к ошибкам идентификации баркодов и дальнейшего отнесения прочтений к образцам [8]. По этой причине перед нами стояла задача подобрать баркоды таким образом, чтобы они формировали наиболее сбалансированные комбинации. В основу алгоритма подбора последовательностей лег «метод четверок», который предполагает добавление к баркодам из набора MGI трех баркодов, полученных последовательной заменой оснований (рис. 1А, Б).

Согласно методу четверок, каждый из 96 баркодов может стать *root*-баркодом своей четверки. Таким образом можно получить $96 \times 4 = 384$ уникальных баркода.

Поскольку доля каждого основания в каждой позиции составляет 25%, полученная комбинация сбалансирована и гарантирует высокое качество секвенирования.

Проверка на соответствие критериям

Проверка на совместимость по сбалансированности

Поскольку каждая четверка является идеально сбалансированной, можно комбинировать любое количество четверок между собой. При этом соотношение долей четверок внутри пула может быть разным, однако внутри четверок доли баркодов должны быть одинаковыми.

Кроме того, мы проверили, возможно ли формировать пулы, содержащие $4n + 2$ баркода, где n — количество четверок. Проверку совместимости проводили на примере комбинации из 10 баркодов с помощью программы BC-store (рис. 2). Доля каждого нуклеотида (nucleotide fraction) в любой позиции в пуле из 10 баркодов имеет минимальное и максимальное отклонения, равные 0,2 и 0,3, и соответствует критериям сбалансированной комбинации. Это справедливо при добавлении двух

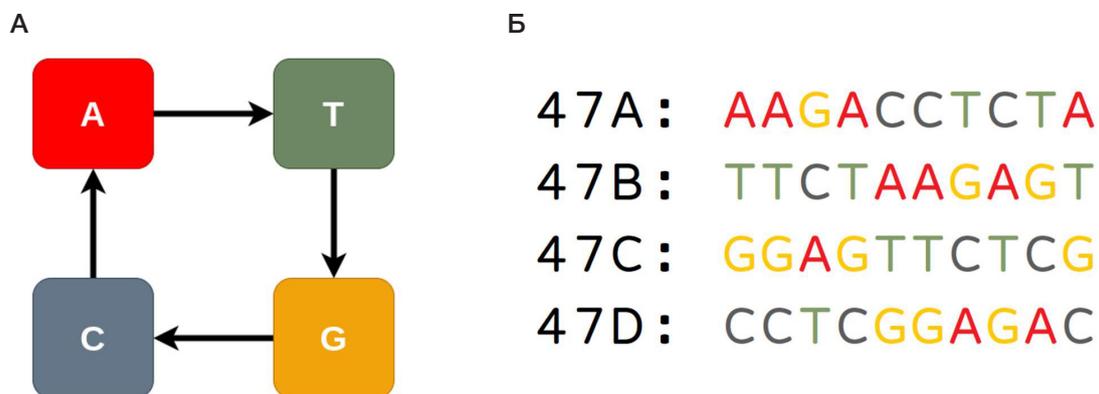


Рис. 1. А. Принцип метода четверок. Каждый баркод MGI является основой четверки, кастомные баркоды формируются с последовательной заменой в каждом положении исходного баркода А на Т, Т на G, G на C, C на А. Б. Пример четверки баркодов. 47А — исходный баркод MGI, 47В, 47С, 47D — сформированные на его основе по методу четверок кастомные баркоды

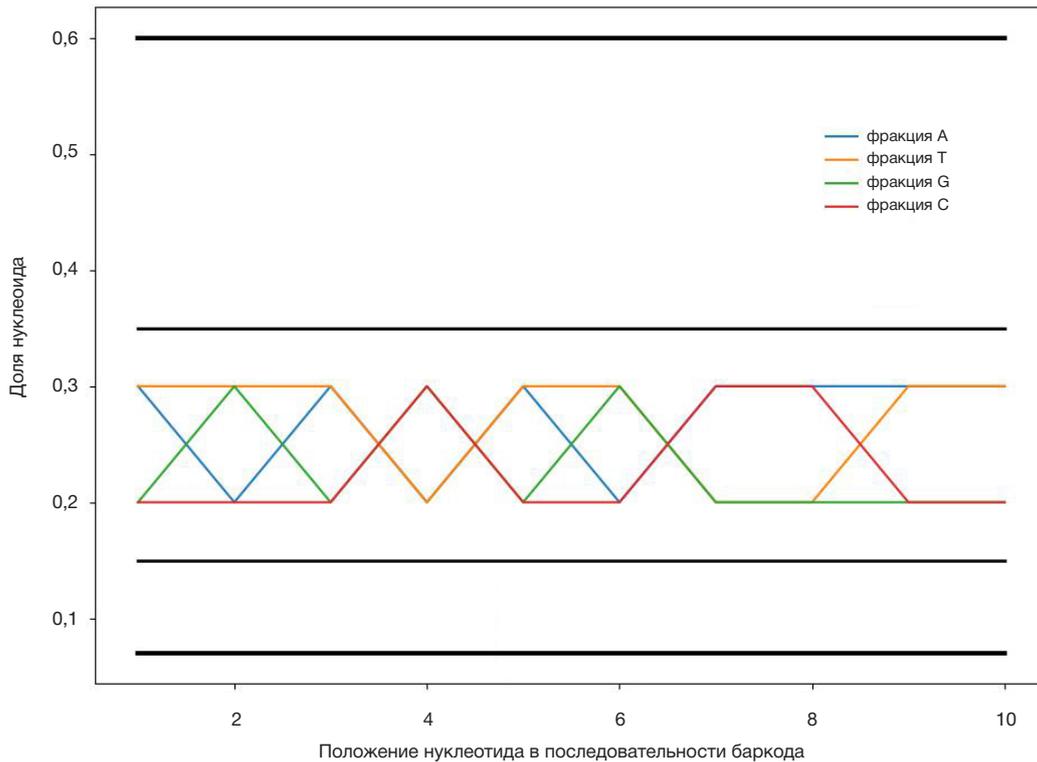


Рис. 2. Нуклеотидный баланс в пуле из $4n + 2$ баркода. Цветные линии представляют нуклеотидные фракции. Черные жирные линии — границы слабого критерия. Тонкие линии — границы сильного критерия совместимости баркодов [8]

любых баркодов из одной четверки в равном или меньшем соотношении к n количеству четверок.

Проверка на совместимость баркодов по количеству несовпадающих нуклеотидов

На следующем этапе все четверки были проверены на совместимость по количеству несовпадающих нуклеотидов (мисматчей). Каждый образец, маркированный баркодом, должен быть распознан однозначно, поэтому последовательности баркодов не должны совпадать на определенное количество нуклеотидов. Нами был выбран порог в 4 мисматча, так как все из 96 10-нуклеотидных баркодов производителя отличаются друг от друга не менее чем на четыре нуклеотида. В анализ также был включен баркод 999 верификации MGI (техническая последовательность длиной 10 п.н., присутствующая в файле демультиплексирования оригинального программного обеспечения). Построив граф несочетаемых четверок (см. приложение, рис. S1) и используя матрицу смежности (см. приложение, рис. S2), мы отобрали 63 четверки (252 баркода), совместимые друг с другом по количеству допустимых мисматчей (рис. 3). Последовательности всех 252 баркодов приведены в приложении (табл. S1).

Проверка на уникальность

Мы проверили, не встречаются ли предложенные нами последовательности баркодов среди оригинальных MGI. Это необходимо для составления файла с баркодами для автоматического демультиплексирования. Для этого была построена диаграмма Венна с набором кастомных и оригинальных MGI баркодов (рис. 4). В результате было получено 63 пересечения, где все 63 баркода — оригинальные MGI, и 189 — уникальные, не совпадающие с MGI из разных наборов.

Подготовка к секвенированию

Синтез адаптера

Согласно протоколу производителя, для создания индивидуального адаптера необходим отжиг двух олигонуклеотидов, один из которых (top) содержит последовательность баркода и фосфат на 5'-конце (Ad153_5T_1-index # (1~128) у производителя), а Bottom-олигонуклеотид имеет частично комплементарную верхнему (top) последовательность (Ad153Ω_Bottom_2) (https://en.mgitech.cn/Download/download_file/id/71) [12].

Последовательности олигонуклеотидов с баркодами 1A-1D приведены в табл. 1, полный список со всеми 252 баркодами в приложении (табл. S1).

Приготовление адаптеров осуществляли следующим образом. К 70 мкл LowTE буфера добавляли 1 мкл 5M NaCl, 10 мкл 200 мкМ top-олигонуклеотида, и 10 мкл 200 мкМ Bottom-олигонуклеотида. Далее нагревали до 95 °C в течение 2 мин и постепенно охлаждали до 17 °C с шагом 0,5 °C длительностью 30 с.

Алгоритм добавления новых баркодов на секвенатор

Для автоматического демультиплексирования секвенированных библиотек, следуя рекомендациям MGI, мы создали файл .csv (см. приложение, табл. S2), содержащий последовательности баркодов, включая новые кастомные, оригинальные MGI и 999-валидационный. Баркоды MGI, вошедшие в состав четверок, имели вид nA , где n — номер адаптера в оригинальном наборе MGI. Кастомные баркоды были обозначены nB , nC , nD — в соответствии с порядком формирования четверок. Запись оригинальных баркодов MGI, не вошедших в четверки, осталась неизменной. Номера баркодов были отделены от последовательностей запятыми без пробелов.

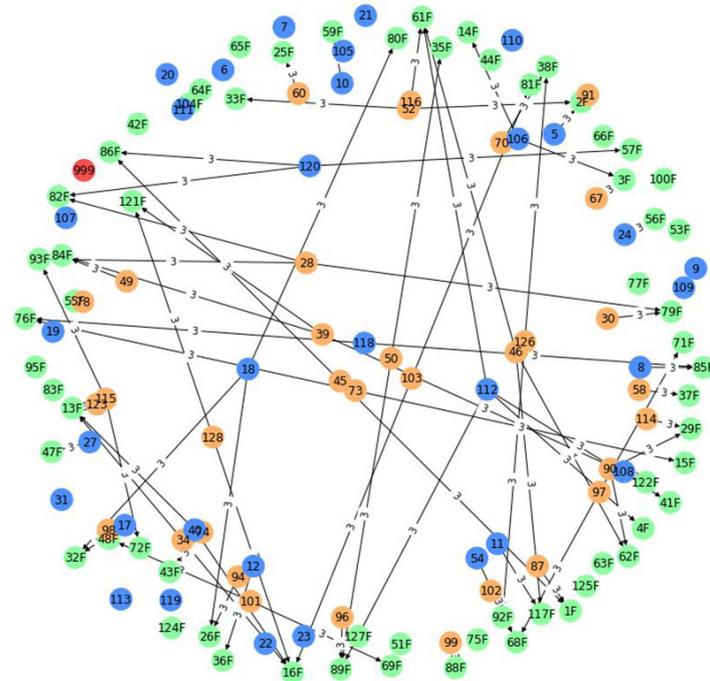


Рис. 3. Граф несочетаемости 63 четверок и баркодов MGI, не вошедших в их состав. Зеленым выделены четверки, прошедшие фильтрацию по числу мисматчей; оранжевым — баркоды из 96-баркодного набора MGI, не задействованные в четверках; синим — баркоды MGI из 128-баркодного набора MGI, отсутствующие в 96-баркодном наборе; красным — 999-проверочный баркод MGI. Линией соединены несовместимые баркоды и четверки, число над линией — минимальное значение мисматчей между ними

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проверки разработанных нами баркодов, были подготовлены библиотеки с синтезированными кастомными адаптерами. Библиотеки, подготовленные по стандартному протоколу MGI, были объединены в пул и обогащены с помощью набора SureSelect Human All Exon v7 [13], а затем секвенированы в режиме PE100 на приборе DNBSEQ G-400.

Демультимплексирование Fastq выполнялось программным обеспечением, встроенным в G-400, MGI basecallite, на основе загруженного файла с последовательностями баркодов. По умолчанию алгоритм относит прочтение в категорию «undecoded» (не декодированные данные),

если в последовательности баркода длиной 10 п.н. есть два или более несоответствий. Таким образом доля недекодированных прочтений может быть использована в качестве метрики качества синтезированных адаптеров.

Мы сравнили долю недекодированных прочтений в общих данных с каждой дорожки с кастомными баркодами (44 дорожки ячеек для секвенирования) и данные предыдущих запусков (44 дорожки), в которых использовались баркоды MGI. В среднем (среднее ± SD) доля недекодированных чтений на одной дорожке составила $1,08 \pm 0,19\%$ и $1,68 \pm 0,22\%$ для адаптеров MGI и кастомных адаптеров соответственно (рис. 5). Хотя доля недекодированных данных увеличилась при использовании предложенных баркодов по сравнению с оригинальными

Сравнение наборов MGI и кастомного

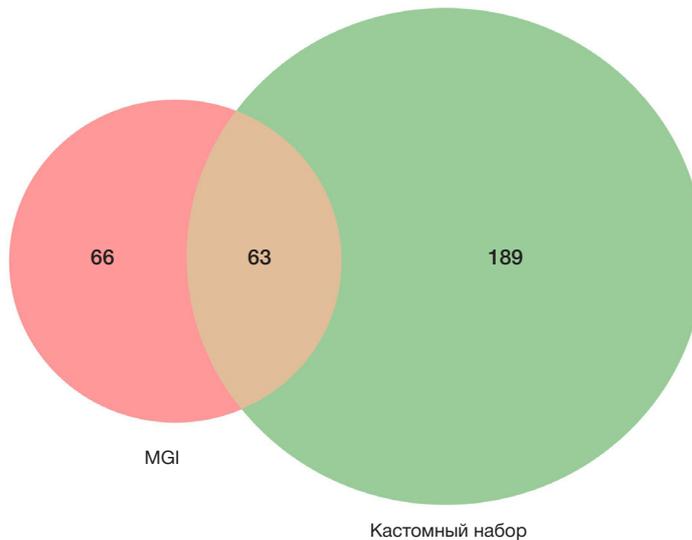


Рис. 4. Диаграмма Венна для сравнения последовательностей кастомных и оригинальных MGI баркодов из 128-баркодного набора и 999-го проверочного баркода MGI. Кастомные баркоды показаны зеленым цветом, оригинальные MGI, не пересекающиеся с четверками, — красным, а перекрывающиеся, которые были использованы в качестве root-баркодов для четверок, — оранжевым

Таблица. Пример последовательностей баркодов и полных последовательностей олигонуклеотидов для приготовления адаптеров. Ad_Bttm -bottom oligo

Имя	Последовательность баркода	Последовательность олигонуклеотида с баркодом
1A	TAGGTCCGAT	/5Phos/AGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAATAGGTCCGATCAACTCCTTGGCTCACA
1B	GTCCGAACTG	/5Phos/AGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAAGTCCGAACTGCAACTCCTTGGCTCACA
1C	CGAACTTAGC	/5Phos/AGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAACGAACCTTAGCCAACCTCCTTGGCTCACA
1D	ACTTAGGTCA	/5Phos/AGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAAACTTAGGTCAACTCCTTGGCTCACA
Ad_Bttm		TTGTCTTCTTAAGGAACGACATGGCTACGATCCGACTT

($T = 13.5$, $df = 83$, $p\text{-value} = 1.17E-22$), абсолютное значение по отношению к общему количеству данных, полученных с одной дорожки, можно считать незначительным. Отношение не декодированных данных к общим данным в ГБ представлены в приложении (табл. S3).

Таким образом, мы разработали подход для создания собственных баркодов, позволяющий одновременно секвенировать более 96 образцов на 1 дорожке секвенаторов MGI. Мы получили 189 кастомных баркодов, которые можно комбинировать с 63 баркодами MGI для создания 63 сбалансированных четверок. Один баркод из каждой четверки представляет собой оригинальный MGI (nA , где n — номер оригинального баркода), а три других — дополняющие его пользовательские баркоды (nB , nC , nD).

Эти четверки можно комбинировать друг с другом в любом количестве и соотношении, пока соотношение между баркодами одной четверки остается равным. Также возможно составлять пулы библиотек с числом баркодов $4n+2$, где n — число четверок, к которым можно добавить два любых баркода из другой четверки. В этом случае доли двух последних баркодов не должны превышать доли остальных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Платформа MGI предназначена для быстрого высокопроизводительного секвенирования и обладает неоспоримыми преимуществами, но при этом имеет ряд ограничений. Мы попытались преодолеть некоторые ограничения, обусловленные решениями и наборами,

предлагаемыми производителем. Наш подход позволяет повысить эффективность секвенирования и расширить возможности платформы MGI. Однако важно учитывать, что комбинации четверок с некоторыми оригинальными адаптерами MGI, не входящими в состав четверок, могут не соответствовать критерию совместимости по числу несовпадений. Поэтому мы рекомендуем проверить их сбалансированность с помощью программы BC-Store. Мы предполагаем, что более высокое значение количества не декодированных чтений может быть связано с недостаточной чистотой синтезированных олигонуклеотидов по сравнению с MGI [14]. Ранее мы заказывали синтез одинаковых баркодов у двух разных производителей и наблюдали, что в случае одного из них доля не декодированных чтений была повышенной.

ВЫВОДЫ

Подобранные нами баркоды позволяют варьировать соотношение и количество библиотек, загружаемых на дорожку ячейки для секвенирования, в зависимости от задач и требуемого количества данных на выходе. В совокупности с применением разработанной нами ранее программы BC-store можно значительно упростить и ускорить задачу составления пулов библиотек для секвенирования на приборах MGI как в парноконцевом, так и одноконцевом режиме. Учитывая все преимущества и недостатки разработанного нами метода, его можно использовать в качестве дополнительного или альтернативного решения к предложенному производителем MGI.

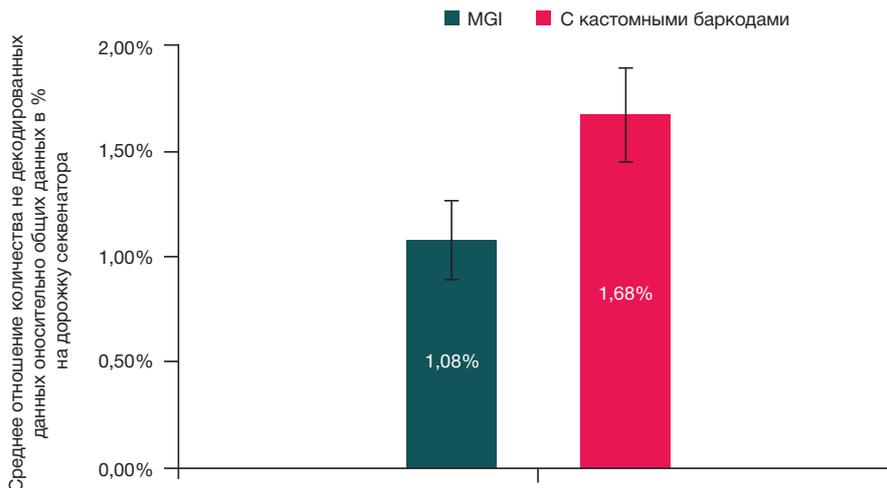


Рис. 5. Среднее значение доли undecoded (%) от общего числа полученных данных (Gb) на дорожку ячейки для библиотек с MGI-баркодами (показано голубым; данные для 44 дорожек), с кастомными баркодами (показано красным; данные для 44 дорожек)

Литература

1. Jeon SA, Park JL, Park SJ, Kim JH, Goh SH, Han JY, et al. Comparison between MGI and Illumina sequencing platforms for whole genome sequencing. *Genes Genomics*. 2021; 43: 713–24. DOI: 10.1007/s13258-021-01096-x.
2. Kim HM, Jeon S, Chung O, Jun JH, Kim HS, Blazyte A, et al. Comparative analysis of 7 short-read sequencing platforms using the Korean Reference Genome: MGI and Illumina sequencing benchmark for whole-genome sequencing. *Gigascience*. 2021; 10. DOI: 10.1093/gigascience/giab014.
3. Xu Y, Lin Z, Tang C, Tang Y, Cai Y, Zhong H, et al. A new massively parallel nanoball sequencing platform for whole exome research. *BMC Bioinformatics*. 2019; 20. DOI: 10.1186/s12859-019-2751-3.
4. Drmanac R, Sparks AB, Callow MJ, Halpern AL, Burns NL, Kermani BG, et al. Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science* (1979). 2010; 327: 78–81. DOI: 10.1126/science.1181498.
5. Fadrosh DW, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. 2014. Available from: <http://www.microbiomejournal.com/content/2/1/6>.
6. Baym M, Kryazhimskiy S, Lieberman TD, Chung H, Desai MM, Kishony RK. Inexpensive multiplexed library preparation for megabase-sized genomes. *PLoS One*. 2015; 10. DOI: 10.1371/journal.pone.0128036.
7. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79: 5112–20. DOI: 10.1128/AEM.01043-13.
8. Bulusheva I, Belova V, Nikashin B, Korostin D. BC-store: A program for MGISEQ barcode sets analysis. *PLoS One*. 2021; 16. DOI: 10.1371/journal.pone.0247532.
9. Faircloth BC, Glenn TC. Not all sequence tags are created equal: Designing and validating sequence identification tags robust to indels. *PLoS One*. 2012; 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0042543.
10. Trébeau C, De Monvel JB, Tai FWJ, Petit C, Etournay R. DNA Barcode Compatibility: An R-package for optimizing DNA-barcode combinations in multiplex sequencing experiments. *Bioinformatics*. 2019; 35: 2690–1. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty1030.
11. Varet H, Coppée JY. CheckMyIndex: A web-based R/Shiny interface for choosing compatible sequencing indexes. *Bioinformatics*. 2019; 35: 901–2. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty706.
12. Oligos and primers for BGISEQ/DNBSEQ/MGISEQ - MGI Tech. Available from: https://en.mgitech.cn/Download/download_file/id/71.
13. SureSelectXT HS Target Enrichment System For Illumina Multiplexed Sequencing Platforms, Version D1, July 2021. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G7530-90000.pdf>.
14. Li Q, Zhao X, Zhang W, Wang L, Wang J, Xu D, et al. Reliable multiplex sequencing with rare index mis-assignment on DNB-based NGS platform. *BMC Genomics*. 2019; 20. DOI: 10.1186/s12864-019-5569-5.

References

1. Jeon SA, Park JL, Park SJ, Kim JH, Goh SH, Han JY, et al. Comparison between MGI and Illumina sequencing platforms for whole genome sequencing. *Genes Genomics*. 2021; 43: 713–24. DOI: 10.1007/s13258-021-01096-x.
2. Kim HM, Jeon S, Chung O, Jun JH, Kim HS, Blazyte A, et al. Comparative analysis of 7 short-read sequencing platforms using the Korean Reference Genome: MGI and Illumina sequencing benchmark for whole-genome sequencing. *Gigascience*. 2021; 10. DOI: 10.1093/gigascience/giab014.
3. Xu Y, Lin Z, Tang C, Tang Y, Cai Y, Zhong H, et al. A new massively parallel nanoball sequencing platform for whole exome research. *BMC Bioinformatics*. 2019; 20. DOI: 10.1186/s12859-019-2751-3.
4. Drmanac R, Sparks AB, Callow MJ, Halpern AL, Burns NL, Kermani BG, et al. Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science* (1979). 2010; 327: 78–81. DOI: 10.1126/science.1181498.
5. Fadrosh DW, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. 2014. Available from: <http://www.microbiomejournal.com/content/2/1/6>.
6. Baym M, Kryazhimskiy S, Lieberman TD, Chung H, Desai MM, Kishony RK. Inexpensive multiplexed library preparation for megabase-sized genomes. *PLoS One*. 2015; 10. DOI: 10.1371/journal.pone.0128036.
7. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79: 5112–20. DOI: 10.1128/AEM.01043-13.
8. Bulusheva I, Belova V, Nikashin B, Korostin D. BC-store: A program for MGISEQ barcode sets analysis. *PLoS One*. 2021; 16. DOI: 10.1371/journal.pone.0247532.
9. Faircloth BC, Glenn TC. Not all sequence tags are created equal: Designing and validating sequence identification tags robust to indels. *PLoS One*. 2012; 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0042543.
10. Trébeau C, De Monvel JB, Tai FWJ, Petit C, Etournay R. DNA Barcode Compatibility: An R-package for optimizing DNA-barcode combinations in multiplex sequencing experiments. *Bioinformatics*. 2019; 35: 2690–1. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty1030.
11. Varet H, Coppée JY. CheckMyIndex: A web-based R/Shiny interface for choosing compatible sequencing indexes. *Bioinformatics*. 2019; 35: 901–2. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty706.
12. Oligos and primers for BGISEQ/DNBSEQ/MGISEQ - MGI Tech. Available from: https://en.mgitech.cn/Download/download_file/id/71.
13. SureSelectXT HS Target Enrichment System For Illumina Multiplexed Sequencing Platforms, Version D1, July 2021. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G7530-90000.pdf>.
14. Li Q, Zhao X, Zhang W, Wang L, Wang J, Xu D, et al. Reliable multiplex sequencing with rare index mis-assignment on DNB-based NGS platform. *BMC Genomics*. 2019; 20. DOI: 10.1186/s12864-019-5569-5.

КЛИНИЧЕСКИЕ ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ СРЕДИ ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ СЕВЕРНОЙ ОСЕТИИ – АЛАНИИ

Р. А. Зинченко¹, И. С. Тебиева^{2,3}, В. В. Кадышев¹, А. Ф. Муртазина¹, А. О. Боровиков¹, А. В. Марахонов¹, А. В. Перепелов⁴, З. К. Гетоева⁵, С. И. Куцев¹

¹ Медико-генетический научный центр имени Н. П. Бочкова, Москва, Россия

² Северо-Осетинская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения России, Владикавказ, Россия

³ Республиканская детская клиническая больница, Владикавказ, Россия

⁴ Обнинский институт атомной энергетики, филиал Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск, Россия

⁵ Центр охраны материнства и детства г. Сочи Министерства здравоохранения Краснодарского края, Сочи, Россия

Современные знания о кумулятивной распространенности, разнообразии и частоте встречаемости отдельных орфанных наследственных болезней (ОНБ) среди детского населения ограничены в РФ и мировых исследованиях несмотря на широкую востребованность для здравоохранения и общества. Для ОНБ характерны изменчивость и неоднородность вышеперечисленных показателей для разных популяций, которая также проявляется в широкой генетической гетерогенности. Целью работы было изучение ОНБ среди детского населения Республики Северная Осетия – Алания (РСО-А). Обследовано 543 817 человек, в том числе 145560 детей (от 0 до 18 лет). Рассчитана кумулятивная распространенность аутосомно-рецессивной (АР), аутосомно-доминантной (АД) и Х-сцепленной (Х-сц.) наследуемой патологии. По полученным результатам, суммарная распространенность ОНБ среди детей РСО-А составляет 1 : 119, т. е. 1% детей имеет диагноз ОНБ. В сельской местности суммарная отягощенность детского населения всеми типами ОНБ более чем в 2 раза выше, чем в городах и районных центрах. Выявлен 1241 пациент (из 1037 семей) с 241 нозологической формой ОНБ (109 форм — с АД-наследованием, 102 — с АР и 30 — с Х-сц.). Особенностью обследованной популяции является высокая распространенность трех заболеваний, ранее не установленных в подобных исследованиях: врожденная миастения 12-го типа, редкая форма врожденной дисфункции коры надпочечников — дефицит 3-бета-гидроксистероиддегидрогеназы, синдром брахидактилии типа Е — амелогенеза — умственной отсталости — нанизма. Таким образом, население РСО-А характеризуется специфическим спектром ОНБ, обусловленных редкими мутациями, часть из которых редко встречается в других популяциях мира и РФ. Обращает на себя внимание более высокая распространенность данного спектра патологий в сельских популяциях. Выявленные показатели свидетельствуют о необходимости разработки специализированных регион-специфических программ для профилактики детской инвалидности и/или летальности.

Ключевые слова: орфанные наследственные заболевания, кумулятивная распространенность наследственных болезней среди детей, разнообразие частых наследственных болезней среди детей, Республика Северная Осетия – Алания, Российская Федерация

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания ФГБНУ «МГНЦ» Минобрнауки России и Минздрава РСОА.

Вклад авторов: Р. А. Зинченко, И. С. Тебиева, В. В. Кадышев, А. Ф. Муртазина, А. О. Боровиков, А. В. Перепелов, З. К. Гетоева — обследование пациентов, постановка диагноза, получение информированного согласия и забор биоматериала; Р. А. Зинченко, И. С. Тебиева — сбор данных о количестве пациентов; Р. А. Зинченко, И. С. Тебиева, С. И. Куцев — планирование исследования, выполнение статистического анализа, написание рукописи; А. В. Марахонов — анализ молекулярно-генетических исследований; И. С. Тебиева, А. В. Марахонов, Р. А. Зинченко — редактирование; Р. А. Зинченко, С. И. Куцев — общее руководство, редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ Медико-генетический научный центр имени Н. П. Бочкова (протокол № 7 от 20 декабря 2017 г.), соответствует стандартам добросовестной клинической практики и доказательной медицины. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в его проведении.

✉ **Для корреспонденции:** Рена Абульfazовна Зинченко
ул. Москворечье, д. 1, 115522, г. Москва, Россия; renazinchenko@mail.ru

Статья получена: 06.08.2024 **Статья принята к печати:** 20.09.2024 **Опубликована онлайн:** 17.10.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.041

CLINICAL POPULATION GENETIC STUDIES OF HEREDITARY DISEASES IN THE PEDIATRIC POPULATION OF NORTH OSSETIA – ALANIA

Zinchenko RA¹, Tebieva IS^{2,3}, Kadyshv VV¹, Murtazina AF¹, Borovikov AO¹, Marakhonov AV¹, Perepelov AV⁴, Getoeva ZK⁵, Kutsev SI¹

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

² North-Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russia

³ Republican Children's Clinical Hospital, Vladikavkaz, Russia

⁴ Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, branch of the National Research Nuclear University (NRNU) MEPhI, Obninsk, Russia

⁵ Center of Protection of Motherhood and Childhood of the City of Sochi of the Ministry of Health of Krasnodar Krai, Sochi, Russia

Currently, there is limited understanding about the cumulative prevalence, diversity, and frequency of distinct orphan hereditary diseases (OHDs) in the pediatric population, both within the Russian Federation and in the global literature. This gap exists despite a significant demand for such knowledge in healthcare and society. Variability and heterogeneity of the above indicators are common across different populations, reflecting significant genetic heterogeneity of OHDs. The study aimed to assess OHDs in the pediatric population of the Republic of North Ossetia – Alania (RNO-A). A total of 543,817 people were evaluated, including 145,560 children aged 0–18 years. The cumulative prevalence of autosomal recessive (AR), autosomal dominant (AD), and X-linked (XL) OHDs was determined. The findings indicate an overall prevalence of OHDs among children of the RNO-A of 1 : 119, meaning that approximately 1% of children are diagnosed with these conditions. Notably, the total burden in children of all types of OHDs in rural areas exceeds that in urban areas and district centers by more than twofold. We identified 1,241 patients from 1,037 families with 241 distinct OHDs (109 with AD inheritance, 102 with AR inheritance, and 30 with XL inheritance). Three diseases were particularly prevalent in this population and have not been documented in similar studies: congenital myasthenia type 12, a rare form of congenital adrenal cortex dysfunction (3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency), and brachydactyly E — amelogenesis — mental retardation — nanism syndrome. Thus, the population of the RNO-A exhibits a unique spectrum of OHDs caused by rare mutations, some of which are infrequent in other populations of the world and the Russian Federation. The significantly higher prevalence of these disorders in rural populations is noteworthy, underscoring the need for tailored, region-specific programs aimed at preventing childhood disability and/or mortality.

Keywords: orphan hereditary diseases, cumulative prevalence of hereditary diseases among children, diversity of hereditary diseases common among children, Republic of North Ossetia–Alania, Russian Federation

Funding: the study was supported as part of the State Assignment of the Research Centre for Medical Genetics and the Ministry of Health of the Republic of North Ossetia–Alania.

Author contribution: Zinchenko RA, Tebieva IS, Kadyshv VV, Murtazina AF, Borovikov AO, Marakhonov AV, Getoeva ZK — patient examination, making the diagnosis, obtaining the informed consent, and biomaterial collection; Zinchenko RA, Tebieva IS — acquisition of data on the number of patients; Zinchenko RA, Tebieva IS, Kutsev SI — study planning, statistical analysis, manuscript writing; Marakhonov AV — analysis of molecular genetic tests; Tebieva IS, Marakhonov AV, Zinchenko RA — editing; Zinchenko RA, Kutsev SI — general management, editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Centre for Medical Genetics (protocol No. 7 dated 20 December 2017), it was compliant with the standards of Good Clinical Practice and evidence-based medicine. All patients submitted informed consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Rena A. Zinchenko
Moskvorechie, 1, 115522, Moscow, Russia; renazinchenko@mail.ru

Received: 06.08.2024 **Accepted:** 20.09.2024 **Published online:** 17.10.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.041

Согласно международной базы данных OMIM, число нозологических форм орфанных наследственных болезней (ОНБ) составляет около 7000–8000. Большая часть из них (более 80%) относится к редким, т. е. встречается реже, чем 1 случай на 1 млн [1]. На частые ОНБ приходится 10–20% нозологических форм, однако число больных с этими заболеваниями составляет более 60% [2, 3]. Отягощенность населения ОНБ по результатам исследований варьирует от 5 до 17 на 1000 человек [4], при этом основная его доля приходится именно на детское население (> 2%), в связи с их сниженной выживаемостью и приспособленностью при тяжелых нозологиях. ОНБ манифестируют в 30% случаев при рождении и в 87% случаев — к завершению пубертатного периода [5]. Проблема ОНБ имеет большую значимость как для здравоохранения, так и для общества в целом, так как многие случаи таких заболеваний характеризуются высокой инвалидизацией и летальностью — не менее 35% детской смертности в развитых странах связано с ОНБ [2, 3].

Для ОНБ характерны изменчивость и неоднородность показателей кумулятивной распространенности и разнообразия ОНБ для разных стран и популяций, которая также проявляется в генетической гетерогенности [6]. Современные знания о генетическом грузе в популяциях человека, разнообразии, распространенности и гетерогенности ОНБ среди детского населения незначительны, основные публикации как в России, так и в других странах посвящены анализу данных по госпиталям либо проведены в конкретных этнических популяциях [2, 7–16]. В РФ клинические популяционно-генетические исследования ОНБ среди детского населения с регистрацией максимально возможного числа заболеваний в отдельных субъектах федерации проводятся только в рамках ФГБНУ «МГНЦ» и находятся в процессе дальнейших разработок. Показана дифференциация популяций как по распространенности отдельных нозологий, так и по кумулятивной распространенности ОНБ, что подтверждает необходимость изучения каждого региона для возможности оптимизации регион-специфической помощи пациентам [17–20].

Цель исследования — изучить ОНБ среди детского населения Республики Северная Осетия – Алания (РСО-А).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проведено медико-генетическое обследование населения РСО-А. На предмет выявления ОНБ осмотрено население разных возрастных групп всех восьми сельских районов

и г. Владикавказ. Обследование населения проводили в соответствии с созданным более 40 лет назад коллективом ФГБНУ «МГНЦ» протоколом обследования небольших по численности популяций РФ (ранга района и малых городов) и апробированным за прошедший период на 15 субъектах РФ (110 сельских районов). Протокол опубликован ранее [21–24]. Выявление пациентов с врожденной и предположительно наследственной патологией осуществляли через врачей и фельдшеров медицинских учреждений республики при помощи разработанной анкеты. Анкета представляет собой перечень симптомов (неврологических, офтальмологических, дерматологических, скелетных, эндокринологических, генетических и пр.) различных ОНБ, распределенных по основным медицинским специальностям. В дополнение к полученным спискам использовали данные медико-социальной экспертизы (МСЭК) и прочих медицинских и социальных источников. Учитывая, что каждый симптом может быть характерен не для одного заболевания, а как правило для группы болезней, совокупная клиническая картина предполагает выявление максимально возможного числа случаев ОНБ (поражающих как отдельные системы, так и многие органы). Осмотр семей и пациентов разных возрастных групп осуществляли в ходе консилиума специалистов различных медицинских специальностей, что дало возможность выявить широкий круг ОНБ [20–24]. Верификацию диагнозов проводили на основании клинических, инструментальных и лабораторных методов (биохимические, цитогенетические, молекулярно-генетические и др.).

Количество реально обследованного населения РСО-А (период 2017–2023 гг.) составило 543 817 человек, в том числе 145 560 (26,77%) детей от 0 до 18 лет (табл. 1) Проведен эпидемиологический анализ ОНБ у детского населения РСО-А.

С учетом гетерогенности многих ОНБ для подтверждения определенного типа наследования (аутосомно-доминантного — АД, аутосомно-рецессивного — АР и X-сцепленного — X-сц.) проведен сегрегационный анализ, показавший правильность полученного распределения: $p = 0,27 \pm 0,06$ (ожидаемая 0,25) при АР наследовании и $p = 0,49 \pm 0,04$ (ожидаемая 0,5) для АД наследования [25–26].

Расчет кумулятивной распространенности или генетического груза ОНБ на 1000 обследованных по популяциям проведен по формуле: $n / (N / 1000)$, где n — число больных, N — численность детей. Ошибка к значению показателя генетического груза ОНБ рассчитана

Таблица 1. Численность обследованного населения

№	Район	Городское население		Сельское население		Все население	
		Все	Дети	Все	Дети	Все	Дети
1	Ардонский	19 800	4296 (21,70%)	11 632	2700 (23,21%)	31 432	6996 (22,06%)
2	Правобережный	37 029	13 147 (35,50%)	22 683	4224 (18,62%)	59 712	17 371 (29,09%)
3	Кировский	13 500	2374 (17,59%)	14 916	2655 (17,80%)	28 416	5029 (17,70%)
4	Алагирский	20 950	5435 (25,94%)	16 577	2351 (14,18%)	37 527	7786 (20,75%)
5	Дигорский	11 072	2784 (25,14%)	9224	2200 (23,85%)	20 296	4984 (24,56%)
6	Ирафский	7700	2150 (27,92%)	7679	1650 (21,49%)	15 377	3800 (24,71%)
7	Пригородный	10 067	2228 (22,13%)	43 361	9529 (21,98%)	53 428	11 757 (22,01%)
8	Моздокский	42 155	11 630 (27,59%)	48 089	10 469 (21,77%)	90 244	22 099 (24,49%)
9	г. Владикавказ	220 167	65 738 (29,86%)	–	–	220 167	65 738 (29,86%)
	всего	378 873	114 782 (30,29%)	174 161	35 778 (19,08%)	543 817	145 560 (26,77%)

Таблица 2. Кумулятивная распространенность наследственной патологии детского населения (на 1000 обследованных детей) восьми районов и г. Владикавказ РСО-А

Район/субпопуляции	Численность	Генетический груз на 1000 детей/мальчиков*				Распространенность
		АД	АР	Х-сц.*	Суммарно	
Дети из сельской местности						
Ардонский	2700	9,26 ± 1,84	6,30 ± 1,52	5,19 ± 1,96	20,37 ± 2,56	1 : 55
Правобережный	4224	6,16 ± 1,20	6,16 ± 1,20	1,42 ± 0,82	13,73 ± 1,74	1 : 77
Кировский	2655	6,40 ± 1,55	6,40 ± 1,55	6,03 ± 2,12	18,83 ± 2,42	1 : 63
Алагирский	2351	13,19 ± 2,35	7,23 ± 1,75	2,55 ± 1,47	22,97 ± 3,01	1 : 46
Дигорский	2200	10,00 ± 2,12	8,18 ± 1,92	1,82 ± 1,28	20,00 ± 2,92	1 : 52
Ирафский	1650	16,97 ± 3,18	10,30 ± 2,49	3,64 ± 2,09	30,91 ± 4,14	1 : 34
Пригородный	9529	4,51 ± 0,69	4,41 ± 0,68	2,10 ± 0,66	11,02 ± 1,02	1 : 100
Моздокский	10469	7,55 ± 0,85	7,26 ± 0,83	2,29 ± 0,66	17,10 ± 1,23	1 : 63
Средневзвешенное значение	35778	7,57 ± 0,46	6,43 ± 0,42	2,29 ± 0,66	16,69 ± 0,65	1 : 65
Детское население малых городов, райцентры						
Ардонский (г. Ардон)	4296	7,22 ± 1,29	3,96 ± 0,96	1,86 ± 0,93	13,04 ± 1,68	1 : 83
Правобережный (г. Беслан)	13147	2,36 ± 0,42	2,36 ± 0,42	0,76 ± 0,34	5,48 ± 0,62	1 : 196
Кировский (с. Эльхотово)	2374	5,05 ± 1,39	2,95 ± 1,11	2,53 ± 1,46	10,53 ± 1,97	1 : 108
Алагирский (г. Алагир)	5435	4,42 ± 0,89	3,31 ± 0,78	2,58 ± 0,97	10,30 ± 1,28	1 : 111
Дигорский (с. Дигора)	2784	5,39 ± 1,39	4,31 ± 1,24	1,44 ± 1,02	11,14 ± 1,92	1 : 96
Ирафский (с. Чикола)	2150	4,65 ± 1,47	4,65 ± 1,47	0,93 ± 0,93	10,70 ± 2,17	1 : 102
Пригородный	2228	3,14 ± 1,19	3,14 ± 1,19	2,10 ± 0,66	11,02 ± 1,02	1 : 149
Моздокский	11630	3,10 ± 0,52	2,32 ± 0,45	2,24 ± 0,62	7,65 ± 0,75	1 : 153
г. Владикавказ	65738	2,08 ± 0,18	2,49 ± 0,19	1,83 ± 0,24	6,40 ± 0,29	1 : 182
Средневзвешенное значение	109782	2,76 ± 0,16	2,67 ± 0,16	1,75 ± 0,18	7,18 ± 0,24	1 : 159
Отягощенность всего детского населения в ранге района и города						
Ардонский	6996	8,00 ± 1,07	4,86 ± 0,83	3,14 ± 0,95	16,01 ± 1,43	2:09
Правобережный	17371	3,28 ± 0,43	3,28 ± 0,43	0,92 ± 0,33	7,48 ± 0,63	3:22
Кировский	5029	5,57 ± 1,07	4,77 ± 0,97	4,37 ± 1,32	14,91 ± 1,58	2:19
Алагирский	7786	7,06 ± 0,95	4,50 ± 0,76	2,57 ± 0,81	14,13 ± 1,28	1 : 78
Дигорский	4984	7,42 ± 1,22	6,02 ± 1,09	1,61 ± 0,80	15,05 ± 1,68	1 : 70
Ирафский	3800	10,00 ± 1,61	7,11 ± 1,36	2,11 ± 1,05	19,21 ± 2,10	1 : 55
Пригородный	11757	4,25 ± 0,60	4,17 ± 0,59	1,87 ± 0,56	10,29 ± 0,89	1 : 107
Моздокский	22099	5,20 ± 0,48	4,66 ± 0,46	2,26 ± 0,45	12,13 ± 0,70	1 : 91
г. Владикавказ	65738	2,08 ± 0,18	2,49 ± 0,19	1,83 ± 0,24	6,40 ± 0,29	1 : 182
Средневзвешенное значение	145560	3,94 ± 0,16	3,59 ± 0,16	1,98 ± 0,16	9,51 ± 0,24	1 : 117

по формуле $((n/N) \times (1 - (n/N)) / N) / 0,5 \times 1000$, где n — число больных, N — численность детей [25–26].

Для анализа разнообразия ОНБ составлен перечень заболеваний, рассчитана их распространенность (n/N) на 100 000 детей. Генетический груз и распространенность Х-сцепленных ОНБ подсчитаны для мальчиков. Сравнение показателей генетического груза проведено методом χ^2 [17–26].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кумулятивная распространенность ОНБ у детского населения РСО-А

В результате всестороннего обследования населения РСО-А среди детского населения выявлен 1241 пациент (из 1037 семей) с различными нозологическими формами ОНБ, что составило 58,62% от общего числа выявленных больных разных возрастных групп в данном регионе — 2115

больных из 1489 семей. Проведен расчет генетического груза ОНБ в г. Владикавказе и восьми сельских районах РСО-А.

Рассчитана кумулятивная распространенность (на 1000 детей) детского населения РСО-А (в г. Владикавказе, Ардонском, Правобережном, Кировском, Алагирском, Дигорском, Ирафском, Пригородном и Моздокском районах) основными типами ОНБ (АД, АР и Х-сц.) (табл. 2).

Выявлена изменчивость кумулятивной распространенности по субпопуляциям от $5,48 \pm 0,621$ (1 : 196) в г. Беслане до $30,91 \pm 4,137$ (1 : 34) в сельской местности Ирафского района (табл. 2). Анализ 17 субпопуляций показал, что в сельской местности кумулятивная распространенность всех типов ОНБ более чем в 2 раза выше, чем в городах и райцентрах ($\chi^2_{АД} = 54,35$; $\chi^2_{АР} = 48,89$; $\chi^2_{Х-сц.} = 29,46$; $\chi^2_{Сум.} = 136,18$; d.f. = 16; $p < 0,05$), что характерно для популяций РФ [17–20].

Средняя распространенность в рассматриваемой выборке составила 1 : 117 детей, т. е. около 1% детей имеет диагноз ОНБ. Данный показатель колеблется в широких

Таблица 3. Средневзвешенные значения кумулятивной распространенности (генетического груза) ОНБ у детского населения в сельской местности, городах и райцентрах по обследованным популяциям России (на 1000 обследованных детей) [17–20]

Субпопуляции/регионы	Численность	Генетический груз на 1000 детей/мальчиков				Распространенность
		АД	АР	Х-сц.*	Суммарно	
Генетический груз у детей в сельских популяциях						
Кировская область	17 032	6,22 ± 0,60	4,40 ± 0,51	2,35 ± 0,53	12,98 ± 0,83	1 : 85
Ростовская область	55 489	4,99 ± 0,29	3,78 ± 0,26	1,51 ± 0,23	10,29 ± 0,41	1 : 105
Карачаево-Черкессия	38 033	7,47 ± 0,44	5,52 ± 0,38	3,21 ± 0,41	16,20 ± 0,62	1 : 69
Северная Осетия – Алания	35 778	7,57 ± 0,46	6,43 ± 0,42	2,29 ± 0,66	16,69 ± 0,65	1 : 65
Удмуртская Республика	34 400	7,18 ± 0,46	4,24 ± 0,35	2,56 ± 0,39	13,98 ± 0,60	1 : 79
Республика Башкортостан	27 512	5,05 ± 0,43	2,51 ± 0,30	1,96 ± 0,38	9,52 ± 0,56	1 : 117
Республика Татарстан	49 612	4,37 ± 0,29	2,70 ± 0,23	1,09 ± 0,219	8,16 ± 0,39	1 : 131
Чувашская Республика	47 226	2,86 ± 0,25	2,22 ± 0,22	0,93 ± 0,19	6,01 ± 0,34	1 : 180
По всем сельским популяциям	305 082	5,49 ± 0,13	3,86 ± 0,11	1,91 ± 0,11	11,27 ± 0,18	1 : 97
Генетический груз у детей в городах и райцентрах						
Кировская область	20 316	2,31 ± 0,34	1,58 ± 0,28	0,69 ± 0,26	4,58 ± 0,46	1 : 236
Ростовская область	46 356	1,68 ± 0,19	1,42 ± 0,16	0,43 ± 0,14	3,54 ± 0,27	1 : 301
Карачаево-Черкессия	52 706	3,57 ± 0,26	2,73 ± 0,23	1,25 ± 0,22	7,55 ± 0,36	1 : 144
Северная Осетия – Алания	109 782	2,76 ± 0,16	2,67 ± 0,16	1,75 ± 0,18	7,18 ± 0,24	1 : 159
Удмуртская Республика	23 248	2,84 ± 0,35	1,94 ± 0,29	1,20 ± 0,32	5,98 ± 0,48	1 : 186
Республика Башкортостан	32 685	1,90 ± 0,24	1,25 ± 0,19	1,16 ± 0,27	4,31 ± 0,34	1 : 268
Республика Татарстан	15 323	2,22 ± 0,38	1,89 ± 0,35	0,39 ± 0,23	4,50 ± 0,53	1 : 232
Чувашская Республика	20 637	1,45 ± 0,27	2,08 ± 0,32	0,48 ± 0,22	4,02 ± 0,43	1 : 265
По всем городским популяциям	300 416	2,59 ± 0,09	2,16 ± 0,09	1,13 ± 0,08	5,89 ± 0,14	1 : 178
Генетический груз по регионам						
Кировская область	37 348	4,10 ± 0,33	2,86 ± 0,28	1,45 ± 0,28	8,41 ± 0,45	1 : 130
Ростовская область	101 845	3,49 ± 0,18	2,71 ± 0,16	1,02 ± 0,14	10,14 ± 0,73	1 : 149
Карачаево-Черкессия	90 739	5,20 ± 0,23	3,90 ± 0,21	2,07 ± 0,21	11,17 ± 0,33	1 : 99
Северная Осетия – Алания	145 560	3,94 ± 0,16	3,59 ± 0,16	1,98 ± 0,16	9,51 ± 0,24	1 : 117
Удмуртская Республика	60 197	3,34 ± 0,23	1,83 ± 0,17	1,53 ± 0,23	6,69 ± 0,31	1 : 173
Республика Башкортостан	64 935	3,87 ± 0,24	2,51 ± 0,19	0,92 ± 0,17	7,30 ± 0,32	1 : 146
Республика Татарстан	57 648	5,43 ± 0,31	3,31 ± 0,24	2,01 ± 0,26	10,75 ± 0,4	1 : 103
Чувашская Республика	67 863	2,43 ± 0,19	2,18 ± 0,18	0,80 ± 0,15	5,41 ± 0,27	1 : 200
По всем популяциям детей	626 135	3,97 ± 0,08	2,99 ± 0,07	1,53 ± 0,07	8,48 ± 0,11	1 : 130

пределах — от 1 : 34 в сельской местности Ирафского района (более 2% детей) до 1 : 196 (0,5%) в г. Беслан.

Сравнительный анализа кумулятивной распространенности наследственных болезней у детского населения обследованных популяций РФ

Проведен сравнительный анализ кумулятивной распространенности наследственных болезней у детского населения обследованных популяций РФ, включая полученные данные по РСО-А. Необходимо отметить, что доля суммарного количества больных детей от всех выявленных пациентов с ОНБ составила 58,62% (1241/2117 соответственно), хотя доля всего детского населения в республике — 26,77%.

Сравнение значений кумулятивной распространенности АД, АР и Х-сц. заболеваний у детского населения показало, что генетический груз ОНБ у детей в сельской местности выше, чем в городах и райцентрах (табл. 3). Проведенный анализ показал дифференциацию и различия данного показателя между сельским и городским населением. В сельских популяциях у детей получена наибольшая распространенность: 1 : 65 — в РСО-А, 1 : 69 —

в Карачаево-Черкессии, 1 : 79 — в Удмуртии, 1 : 85 — в Кировской области, при среднем значении для «села» 1 : 97, т. е. более чем 1% детей. В малых городах и райцентрах диапазон распространенности составил от 1 : 144 в Карачаево-Черкессии до 1 : 301 в Ростовской области [17–20].

Как следует из табл. 3 и рисунка, полученные значения средней распространенности ОНБ (1 : 117) в настоящем исследовании среди детей РСО-А схожи с данным показателем в других обследованных нами регионах РФ (в Татарстане — 1 : 103, в Башкирии — 1 : 146, в Чувашии — 1 : 200, в Удмуртии — 1 : 173, в Ростовской области — 1 : 149, в Кировской области — 1 : 130, в Карачаево-Черкесской республике — 1 : 99). Важно, что средняя распространенность у детей составляет 1 : 130, т. е. 1% детей имеет диагноз ОНБ, что необходимо учитывать при формировании профилактических программ и программ по лечению орфанных заболеваний.

Разнообразие ОНБ у детского населения РСО-А

В РСО-А среди детского населения выявлен 1241 больной из 1037 семей с различными формами ОНБ. Разнообразие

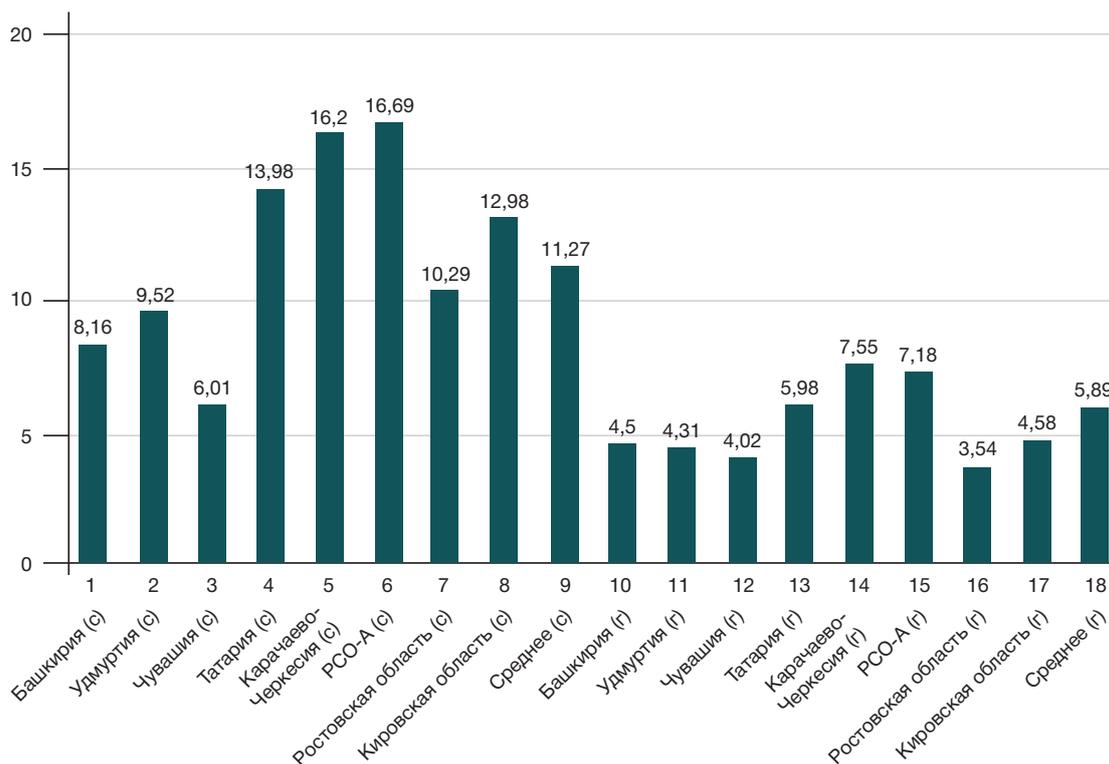


Рис. Кумулятивная распространенность ОНБ городского и сельского детского населения обследованных регионов России

ОНБ — 241 нозологическая форма: 109 с АД-типом наследования, 102 с АР и 30 нозологий с Х-сц. Наибольшее число больных ($n = 880$, 70.91%) зарегистрировано в группе частых 57 (23.65%) нозологий ОНБ, наименьшее ($n = 87$, 7.01%) в группе редких 87 (36.10%) заболеваний (табл. 4).

Большинство заболеваний встречались в ранее обследованных популяциях РФ. В табл. 5 представлено разнообразие частых (чаще, чем 1 : 30 000) ОНБ в РСО-А, средняя распространенность в семи ранее обследованных регионах европейской части РФ (ЕРФ) и данные частоты встречаемости заболеваний по данным международной базы Orfanet [6, 17–20].

Особенностью обследованной популяции является высокая распространенность 11 заболеваний (на 100 000 детей): миотоническая дистрофия среди детей — 6,87 (1 : 14 556), прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна — 37,10 (1 : 2696 мальчиков), нейрофиброматоз I типа — 18,06 (1 : 7661), врожденная миастения, 12 тип — 3,44 (1 : 29112), врожденный Х-сц. ихтиоз — 12,37 (1 : 8087 мальчиков), синдром Мартина–Белл — 9,62 (1 : 10327

мальчиков), синдром Ретта — 8,24 (1 : 12130 мальчиков), ахондроплазия — 9,62/ (1 : 10397), АР несиндромальная нейросенсорная тугоухость 70,76 (1 : 1413), редкая форма врожденной дисфункции коры надпочечников (дефицит 3-бета-гидроксистероиддегидрогеназы 2) — 6,18 (1 : 16173). Все пациенты с вышеперечисленными заболеваниями генотипированы, определена локусная и аллельная гетерогенность. С высокой распространенностью в четырех семьях выявлен ранее не зарегистрированный нами синдром брахидактилии типа E — амелогенеза — умственной отсталости — нанизма 11,28/100 000. Данный синдром представлен в Orfanet, но не картирован.

Остальные заболевания встретились в РСО-А со схожими для других регионов и европейскими данными Orfanet показателями частоты встречаемости [6, 17–20]. Однако хотелось бы отметить высокую распространенность во всех регионах недифференцированной олигофрении, выявленной со всеми типами наследования: АД, АР и Х-сц. в РСО-А (13,74/100 000; 39,85/100 000 и 35,72/100 000 мальчиков соответственно), суммарная распространенность составила 1 : 1400 детей.

Таблица 4. Распределение пациентов и нозологий с ОНБ в зависимости от распространенности заболеваний

Распространенность	Число (%) больных				Число (%) заболеваний			
	АД	АР	Х-сц.	Σ	АД	АР	Х-сц.	Σ
1 1 : 30 000 и чаще	379	388	113	880	23	23	11	57
	69,41%	70,93%	76,35%	70,91%	20,91%	22,33%	39,29%	23,65%
2 1 : 30 001 – 1 : 50 000	69	66	14	149	17	16	4	37
	12,64%	12,07%	9,46%	12,01%	15,45%	15,53%	14,29%	15,35%
3 1 : 50 001 – 1 : 100 000	52	52	21	125	24	23	13	60
	9,52%	9,51%	14,19%	10,07%	21,82%	22,33%	46,43%	24,90%
4 1 : 100 001 – и реже	46	41		87	46	41		87
	8,42%	7,50%		7,01%	41,82%	39,81%		36,10%
ИТОГО	546	547	148	1241	110	103	28	241

Таблица 5. Нозологический спектр и распространенность (на 100 000 детей) частых наследственных болезней (чаще, чем 1 : 30 000), выявленных среди детского населения РСО-А

№	№ OMIM	Диагноз	Т/н	Ч/б	Распространенность		
					PCOA	ЕРФ	
Наследственные неврологические заболевания							
1	162200	Нейрофиброматоз, тип I	АД	29	18,06	13,58	10–15
2	PS308350	Эпилептическая энцефалопатия, ранняя детская	АД	8	5,5	2,56	н/д
3	PS191100	Туберозный склероз	АД	7	4,81	5,75	1–4
4	160900	Миотоническая дистрофия	АД	10	6,87	2,4	1–9
5	PS156200	Несиндромальное нарушение интеллектуального развития, АД	АД	20	13,74	13,42	н/д
6	PS249500	Несиндромальное нарушение интеллектуального развития, АР	АР	58	39,85	39,45	н/д
7	PS309530	Несиндромальное нарушение интеллектуального развития, Х-сц.	Х-сц.	26	35,72	37,69	н/д
8	PS251200	Микроцефалия, олигофрения	АР	23	15,8	17,25	н/д
9	PS251280	Микроцефалия, олигофрения, спастическая параплегия	АР	7	4,81	4,95	н/д
10	610542	Врожденная миастения, 12 тип	АР	5	3,44	н/д	0,1–0,9
11	PS117000	Миопатия врожденная	АР	8	5,5	2,56	н/д
12	310200	Прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна	Х-сц.	27	37,1	17,25	1–9
13	310376	Прогрессирующая мышечная дистрофия Бекера	Х-сц.	3	4,12	2,24	5,4–6
Наследственные заболевания глаз							
14 15	PS116200	Врожденная катаракта	АД, АР	15 11	10,31 7,56	10,54 8,15	н/д
16	231300	Врожденная глаукома	АР	7	4,81	3,83	1–9
17	PS310700	Врожденный нистагм	Х-сц.	8	10,99	11,82	н/д
18	120200	Врожденная колобома глаз	АД	6	4,12	4,47	н/д
19	PS148300	Кератоконус	АД	5	3,44	1,12	н/д
20	PS268000	Пигментный ретинит	АР	5	3,44	2,4	10–50
Наследственные генодерматозы							
21	148700	Ладонно-подошвенный гиперкератоз	АД	15	11,68	13,89	2,5–50
22	146700	Простой ихтиоз	АД	5	3,44	26,99	20–25
23	308100	Ихтиоз, Х-сц.	Х-сц.	9	12,37	15,01	10–50
24	PS305100	Эктодермальная дисплазия	Х-сц.	3	4,12	2,24	0,1–1
Наследственные заболевания скелета							
25	100800	Ахондроплазия	АД	14	9,62	5,43	
26	146000	Гипохондроплазия	АД	6	4,12	3,35	
27	185900	Синдактилия, тип I	АД	5	3,44	6,55	10–50
28	PS166200	Несовершенный остеогенез	АД	9	6,18	7,51	10–50
29	181800	Идиопатический сколиоз	АД	22	15,11	7,35	10–25
30	PS136760	Фронтоназальная дисплазия	АД	7	4,81	3,35	н/д
31	226900	Эпифизарная дисплазия, тип 4	АР	5	3,44	0,8	н/д
Наследственные синдромы							
32 33	PS130000	Синдром Элерса–Данло	АД АР	145 5	99,62 3,44	44,56 2,56	52
34	PS309510	Синдромальное нарушение интеллектуального развития, Х-сц	Х-сц.	12	16,49	3,83	н/д
35	PS119530	Синдром орофациальный	АД	6	4,12	1,6	10–50
36	300624	Синдром Мартина–Белл	Х-Д	7	9,62	5,43	10–50
37	113477	Синдром брахидактилии E — амелогенеза — умственной отсталости — нанизма	АД	9	6,18	н/д	н/д
38	143500	Синдром Жильбера	АР	9	6,18	3,03	н/д
39	PS118100	Синдром Клиппеля–Фейля	АД	6	4,12	2,4	
40	PS163950	Синдром Нунен	АД	5	3,44	4,95	10–50
41	PS180849	Синдром Рубинштейна–Тейби	АД	5	3,44	1,92	
42	185300	Синдром Штурге–Вебера	АД	5	3,44	4,31	1–9
43	312750	Синдром Ретта	Х-сц.	6	8,24	4,15	1–9

Таблица 5. Окончание

Прочая наследственная патология							
44	PS220290	Нейросенсорная несиндромальная тугоухость	AP	103	70,76	61,97	20–50
45	274400	Врожденный гипотиреоз	AP	25	17,18	11,34	
46	261600	Фенилкетонурия	AP	40	24,94	22,02	
47	PS173900	Поликистоз почек	AD	20	13,74	4,63	10–50
48	PS262400	Пангипопитуитаризм	AP	10	6,87	5,91	1–9
49	230400	Галактоземия	AP	12	8,24	2,56	н/д
50	219700	Муковисцидоз	AP	12	8,24	7,35	10–50
51	201910	Адреногенитальный синдром	AP	11	7,56	3,51	1–9
52	201810	Врожденная дисфункция коры надпочечников (дефицит 3-бета-гидроксистероиддегидрогеназы 2)	AP	9	6,18	н/д	< 0,1
53	PS203200	Альбинизм глазо-кожный, 2 тип	AP	6	4,12	2,4	1–9
54	PS203100	Альбинизм глазо-кожный, 1 тип	AP	5	3,44	5,59	1–9
55	608644	Талассемия, бета-	AP	5	3,44	0,8	н/д
56	306700	Гемофилия А	X-сц.	9	12,37	12,14	1–9
57	306900	Гемофилия В	X-сц.	3	4,12	1,92	1–9

Примечание: № OMIM — номера заболеваний по международному каталогу В. Мак Кьюсика OMIM; PS — фенотипическая серия заболеваний гетерогенной группы по OMIM; T/n — тип наследования; Ч/б — число больных; PCO-A — Республика Северная Осетия – Алания; ЕРФ — средние значения распространенности заболевания по результатам генетико-эпидемиологических исследований среди детского населения европейской части РФ; н/д — нет данных; распространенность X-сцепленной патологии представлена на численность мальчиков.

Таким образом проведенный анализ ОНБ показал наличие региональных особенностей спектра и необходимость создания специфических региональных профилактических программ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Число работ по изучению кумулятивной распространенности, разнообразия и особенностей распространения ОНБ среди детского населения в мировой практике ограничено [2, 7–16], в РФ такие исследования проводятся только коллективом ФГБНУ «МГНЦ». Проведенное изучение кумулятивной распространенности ОНБ среди детского населения PCO-A показало изменчивость данного показателя в 17 субпопуляциях региона: от $5,48 \pm 0,621$ (1 : 196) в г. Беслане до $30,91 \pm 4,137$ (1 : 34) в сельской местности Ирафского района. Показаны повышенные более чем в 2 раза величины генетического груза у детского сельского населения 17 субпопуляций по сравнению со значениями в малых городах и райцентрах. Данная ситуация наблюдается по всем ранее обследованным в РФ семи популяциям детей [17–20].

Средняя распространенность ОНБ (1 : 117) среди детей PCO-A (табл. 3 и рисунок) в настоящем исследовании аналогична данным по кумулятивной распространенности в ранее изученных нами регионах РФ (диапазон значений — от 1 : 200 в Чувашии до 1 : 99 в Карачаево-Черкессии). Важно, что средняя распространенность у детей составляет 1 : 130, т. е. 1% детей имеет диагноз ОНБ, что соответствует представленным данным в работах зарубежных коллег [2, 3]. Как для ученых, так и для практического здравоохранения и общества необходимо акцентировать, что доля суммарного количества пациентов с ОНБ в популяциях приходится именно на детей — 58,62% от всех выявленных пациентов в республике, что наблюдается и в других регионах. Средняя доля пациентов с ОНБ детского возраста от всех выявленных больных в восьми обследованных субъектах РФ составила 43,5% (от 35% в Кировской области до 58% в PCOA), хотя доля всего

детского населения в обследованных регионах колеблется от 17,80% в Кировской области до 26,77% в PCOA. Такая ситуация обусловлена высокой летальностью и сниженной приспособленностью генотипов при ряде частых ОНБ [2, 3, 17–20].

Разнообразие ОНБ составило 241 заболеваний (109 с АД-наследованием, 102 с AP и 30 с X-сц.). Наибольшее число больных ($n = 880$, 70,91%) отмечено в группе частых (чаще, чем 1 : 30 000) нозологий ОНБ — 57 (23,65%). Проанализированы спектр частых ОНБ и их распространенность в PCO-A (табл. 5), а также проведено сравнение со средней распространенностью в семи ранее обследованных регионах европейской части РФ (ЕРФ) и данными международной базы Orfanet [6, 17–20].

Особенностью обследованной популяции является высокая распространенность одиннадцати заболеваний, из которых три ранее не встречались в наших исследованиях (на 100 000): врожденная миастения 12-го типа (ген *GFPT1*) — 3,44 (1 : 29 112); редкая форма, встречающаяся в мировой практике у 1% пациентов с врожденной дисфункцией коры надпочечников (дефицит 3-бета-гидроксистероиддегидрогеназы 2 — ген *HSD3B2*) — 6,18 (1 : 16173); синдром брахидактилии типа E — амелогенеза — умственной отсталости — нанизма 11,28 (не картирован).

С высокой распространенностью среди детей (на 100 000) выявлена врожденная митохондрическая дистрофия 1-го типа — 6,87 (1 : 14 556), обусловленная экспансией тринуклеотидного повтора в гене *DMPK*, прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна — 37,10 (1 : 2696 мальчиков), нейрофиброматоз I типа — 18,06 (1 : 7661), врожденный X-сц. ихтиоз — 12,37 (1 : 8087 мальчиков), синдром Мартина–Белл — 9,62 (1 : 10327 мальчиков), синдром Ретта — 8,24 (1 : 12 130 мальчиков), ахондроплазия — 9,62 (1 : 10 397), AP несиндромальная нейросенсорная тугоухость 70,76 (1 : 1413). Все пациенты с вышеперечисленными заболеваниями генотипированы, определена локусная и аллельная гетерогенность.

ВЫВОДЫ

Население РСО-Алания характеризуется специфическим спектром ОНБ, обусловленных редкими мутациями, некоторые из которых не встречаются или встречаются гораздо реже в других популяциях мира и РФ. Обращает на себя внимание более высокая распространенность данного спектра патологий в сельских популяциях. Выявленные показатели свидетельствуют о необходимости разработки специализированных

регион-специфических программ для профилактики детской инвалидности. А тот факт, что наследственная патология у детей характеризуется тяжелым течением, является частой причиной ранней летальности, разработка методов ее профилактики — обязательное направление снижения детской смертности. В целом полученные в настоящем исследовании данные важны с практической точки зрения, а также вносят вклад в мировую науку по фундаментальным эпидемиологическим исследованиям ОНБ.

Литература

1. Online Mendelian Inheritance in Man. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (дата обращения 31.07.2024)
2. Ferreira CR. The burden of rare diseases. *Am J Med Genet.* 2019; 179 (A): 885–92. DOI: 10.1002/ajmg.a.61124.
3. Wakap SN, Lambert DM, Oly A, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *European Journal of Human Genetics.* 2020; 28: 165–73. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>.
4. Passarge E. *Color Atlas of Genetics.* George Thieme Verlag Stuttgart. 5rd ed. New York, USA, 2017; 474 p.
5. Бочков Н. П. Генетика в практике педиатра. *Педиатрия.* 2004; 5: 13–18.
6. Orphanet Reports Series. Available from: <http://www.orpha.net/> (дата обращения 31.07.2024).
7. McKusick VA. Ethnic distribution of disease in non-Jews. *Israel J Med Sci.* 1973; 9: 1375–82.
8. Dong-Dong Wu and Ya-Ping Zhang. Different level of population differentiation among human genes. *BMC Evolutionary Biology.* 2011; 11 (16). DOI: 10.1186/1471-2148-11-16.
9. Goodman RM. Genetic disorders among the Jewish people. *Baltimore: The Gohn Hopkins Univ Press.* 1980; p. 965–970.
10. Norio R. Finnish Disease Heritage I: characteristics, causes, background. *Hum Genet.* 2003; 112: 441–56.
11. Laberge Anne-Marie. Prevalence and distribution of genetic diseases in Quebec: impact of the past on the present. *Medicine sciences.* 2007; 23: 997–1001.
12. De Braekeleer M, Dao T-N. Hereditary disorders in the French Canadian population of Quebec. I. In search of founders. *Hum Biol.* 1994; 66: 205–24.
13. De Braekeleer M, Dao T-N. Hereditary disorders in the French Canadian population of Quebec. II. Contribution of Perche. *Hum Biol.* 1994; 66: 225–50.
14. Verheij JB, ten Kate LP. Mendelian phenotypes in the Netherlands. *Hum Hered.* 1993; 43: 223–31.
15. Zlotogora J, Patrinos GP. The Israeli National Genetic Database: a 10-year experience. *Hum Genomics.* 2017; 11: 5. DOI: 10.1186/s40246-017-0100-z.
16. Zlotogora J, Patrinos GP, Meiner V. Ashkenazi Jewish genomic variants: integrating data from the Israeli National Genetic Database and gnomAD. *Genet Med.* 2018; 20 (8): 867–71. DOI: 10.1038/gim.2017.193.
17. Бессонова Л. А., Ельчинова Г. И., Зинченко Р. А. Популяционная генетика наследственных болезней среди детского населения Республик Башкортостан, Республик Чувашия и Удмуртия. *Генетика.* 2012; 48 (5): 644–54.
18. Зинченко Р. А., Ельчинова Г. И., Ветрова Н. В., Амелина М. А., Петрин А. Н., Амелина С. С. Эпидемиология наследственных болезней среди детского населения 12 районов Ростовской области. Отягощенность наследственных болезней и генетическая структура популяции. *Медицинская генетика.* 2013; 12 (5): 21–28.
19. Зинченко Р. А., Васильева Т. А., Ельчинова Г. И., Петрова Н. В., Петрин А. Н., Гинтер Е. К. Эпидемиология наследственных болезней среди детского населения 8 районов Республики Татарстан. *Якутский медицинский журнал.* 2014; 2: 17–19.
20. Зинченко Р. А., Кадышев В. В., Галкина В. А., Дадали Е. Л., Михайлова Л. К., Марахонов А. В., и др. Клиническая популяционная генетика наследственных болезней среди детского населения Карачаево-Черкесской Республики. *Генетика.* 2019; 55 (8): 964–71. DOI: 10.1134/S00166758190801860.
21. Zinchenko RA, Ginter EK, Marakhonov AV, et al. Epidemiology of rare hereditary diseases in European part of Russia: point and cumulative prevalence. *Frontiers in Genetics.* 2021; 12: 678957. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.678957>.
22. Гинтер Е. К., Ревазов А. А., Таланов М. И. и др. Медико-генетическое изучение населения Костромской области: 2. Разнообразие наследственной патологии в пяти районах области. *Генетика.* 1985; 21 (8): 1294–301.
23. Петрин А. Н., Гинтер Е. К., Руденская Г. И. и др. Медико-генетическое изучение населения Костромской области. Сообщение 4. Отягощенность и разнообразие наследственной патологии в 5 районах области. *Генетика.* 1988; 24 (1): 151–55.
24. Zinchenko RA, Makaov AKh, Marakhonov AV, et al. Epidemiology of hereditary diseases in Karachay-Cherkess Republic. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020; 21 (1): 325. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21010325>.
25. Cavalli-Sforza LL, Bodmer WF. *The Genetics of Human populations.* San Francisco, Freeman WH and Company, 1971; 965 p.
26. Morton NE. Genetic tests under incomplete ascertainment. *Am J Hum Genet.* 1959; 11: 1–16.

References

1. Online Mendelian Inheritance in Man. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (data obrashhenija 31.07.2024)
2. Ferreira CR. The burden of rare diseases. *Am J Med Genet.* 2019; 179 (A): 885–92. DOI: 10.1002/ajmg.a.61124.
3. Wakap SN, Lambert DM, Oly A, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *European Journal of Human Genetics.* 2020; 28: 165–73. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>.
4. Passarge E. *Color Atlas of Genetics.* George Thieme Verlag Stuttgart. 5rd ed. New York, USA, 2017; 474 p.
5. Bochkov NP. *Genetika v praktike pediatria.* *Pediatrija.* 2004; 5: 13–18. Russian.
6. Orphanet Reports Series. Available from: <http://www.orpha.net/> (data obrashhenija 31.07.2024).
7. McKusick VA. Ethnic distribution of disease in non-Jews. *Israel J Med Sci.* 1973; 9: 1375–82.
8. Dong-Dong Wu and Ya-Ping Zhang. Different level of population differentiation among human genes. *BMC Evolutionary Biology.* 2011; 11 (16). DOI: 10.1186/1471-2148-11-16.
9. Goodman RM. Genetic disorders among the Jewish people.

- Baltimore: The Gohn Hopkins Univ Press. 1980; p. 965–970.
10. Norio R. Finnish Disease Heritage I: characteristics, causes, background. *Hum Genet.* 2003; 112: 441–56.
 11. Laberge Anne-Marie. Prevalence and distribution of genetic diseases in Quebec: impact of the past on the present. *Medicine sciences.* 2007; 23: 997–1001.
 12. De Braekeleer M, Dao T-N. Hereditary disorders in the French Canadian population of Quebec. I. In search of founders. *Hum Biol.* 1994; 66: 205–24.
 13. De Braekeleer M, Dao T-N. Hereditary disorders in the French Canadian population of Quebec. II. Contribution of Perche. *Hum Biol.* 1994; 66: 225–50.
 14. Verheij JB, ten Kate LP. Mendelian phenotypes in the Netherlands. *Hum Hered.* 1993; 43: 223–31.
 15. Zlotogora J, Patrinos GP. The Israeli National Genetic Database: a 10-year experience. *Hum Genomics.* 2017; 11: 5. DOI: 10.1186/s40246-017-0100-z.
 16. Zlotogora J, Patrinos GP, Meiner V. Ashkenazi Jewish genomic variants: integrating data from the Israeli National Genetic Database and gnomAD. *Genet Med.* 2018; 20 (8): 867–71. DOI: 10.1038/gim.2017.193.
 17. Bessonova LA, Elchinova GI, Zinchenko RA. Популяционная генетика наследственных болезней среди детского населения Республик Башкортостан, Республик Чувашия и Удмуртия. *Genetika.* 2012; 48 (5): 644–54. Russian.
 18. Zinchenko RA, Elchinova GI, Vetrova NV, Amelina MA, Petrin AN, Amelina SS. Jеpidеmиологiя наследственных болезней среди детского населения 12 районов Ростовской области. Отягощенность наследственными болезнями и генетическая структура популяции. *Медицинская генетика.* 2013; 12 (5): 21–28. Russian.
 19. Zinchenko RA, Vasileva TA, Elchinova GI, Petrova NV, Petrin AN, Ginter EK. Jеpidеmиологiя наследственных болезней среди детского населения 8 районов Республики Татарстан. *Якутский медицинский журнал.* 2014; 2: 17–19. Russian.
 20. Zinchenko RA, Kadyshchev VV, Galkina VA, Dadali EL, Mihajlova LK, Marakhonov AV, i dr. Клиническая популяционная генетика наследственных болезней среди детского населения Карачаево-Черкесской Республики. *Genetika.* 2019; 55 (8): 964–71. DOI: 10.1134/S00166758190801860. Russian.
 21. Zinchenko RA, Ginter EK, Marakhonov AV, et al. Epidemiology of rare hereditary diseases in European part of Russia: point and cumulative prevalence. *Frontiers in Genetics.* 2021; 12: 678957. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.678957>.
 22. Ginter EK, Revazov AA, Talanov MI, i dr. Медико-генетическое изучение населения Костромской области: 2. Разнообразие наследственной патологии в пяти районах области. *Genetika.* 1985; 21 (8): 1294–301. Russian.
 23. Petrin AN, Ginter EK, Rudenskaja GI, i dr. Медико-генетическое изучение населения Костромской области. Сообщение 4. Отягощенность и разнообразие наследственной патологии в 5 районах области. *Genetika.* 1988; 24 (1): 151–55. Russian.
 24. Zinchenko RA, Makaov AKh, Marakhonov AV, et al. Epidemiology of hereditary diseases in Karachay-Cherkess Republic. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020; 21 (1): 325. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21010325>.
 25. Cavalli-Sforza LL, Bodmer WF. *The Genetics of Human populations.* San Francisco, Freeman WH and Company, 1971; 965 p.
 26. Morton NE. Genetic tests under incomplete ascertainment. *Am J Hum Genet.* 1959; 11: 1–16.

НОВЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ИНГИБИТОР РНКаз LORI ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ *IN VITRO*

Д. А. Сухов^{1,2,3}, И. В. Холощенко^{1,4}, Т. В. Петрова¹, Г. А. Романенко^{1,2}, М. Ю. Мышкин³, В. Ю. Кост³, Д. Ю. Трофимов¹, Н. Ю. Усман⁵✉, Е. В. Барсова^{3,5}

¹ ООО «ДНК-Технология», Москва, Россия

² МИРЭА — Российский технологический университет, Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

⁴ Московский государственный технический университет имени Н. Э. Баумана, Москва, Россия

⁵ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Ингибиторы РНКазы давно используют в биотехнологии и лабораторной диагностике. Целью работы было получить и охарактеризовать новый рекомбинантный ингибитор РНКаз LoRI. Полученный новый ингибитор рибонуклеаз LoRI представляет собой рекомбинантный белок массой 63 кДа, оптимизированный для высокопроизводительной экспрессии в *E. coli* и очистки с помощью металлохелатной аффинной хроматографии (IMAC). Продукт получен за счет N-концевого слияния полипептидной последовательности плацентарного ингибитора РНКаз мыши с тиоредаксиновым модулем. Целесообразность данной модификации с точки зрения структуры и функции белка подтверждена *in silico*. Выход очищенного растворимого рекомбинантного продукта в лабораторных условиях составил около 12 мг на 1 л экспрессионной бактериальной культуры. По активности *in vitro* продукт сопоставим с коммерческим аналогом или превосходит его. Кинетические данные соответствуют модели Лайнуивера–Берка.

Ключевые слова: ингибитор рибонуклеаз, тиоредаксин, металлохелатная аффинная хроматография (IMAC), модель Лайнуивера–Берка

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке ООО «ДНК-Технология».

Вклад авторов: Д. А. Сухов, Г. А. Романенко — инженерия, экспрессия и очистка белков; И. В. Холощенко, Т. В. Петрова — характеристика продукта, написание статьи; М. Ю. Мышкин — анализ структуры белка; В. Ю. Кост — дизайн исследования; Д. Ю. Трофимов — руководство проектом; Н. Ю. Усман — написание статьи; Е. В. Барсова — координация проекта, написание статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Наталья Юрьевна Усман
ул. Островитянова, д. 1/1, г. Москва, 117997, Россия; n_usman@rambler.ru

Статья получена: 02.09.2024 **Статья принята к печати:** 09.10.2024 **Опубликована онлайн:** 28.10.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.043

LORI, A NEW RECOMBINANT RNase INHIBITOR FOR *IN VITRO* APPLICATIONS

Sukhov DA^{1,2,3}, Kholoshenko IV^{1,4}, Petrova TV¹, Romanenko GA^{1,2}, Myshkin MYu³, Kost VYu³, Trofimov DYu¹, Usman NYu⁵✉, Barsova EV^{3,5}

¹ DNA-Technology LLC, 117587, Moscow, Russia

² MIREA — Russian Technological University, Moscow, Russia

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

⁴ Bauman Moscow State Technical University, Moscow, Russia

⁵ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The novel ribonuclease inhibitor LoRI is a 63 kDa recombinant protein optimized for high-throughput expression in *E. coli* and purification by metal chelate affinity chromatography (IMAC). The product was obtained by N-terminal fusion of mouse placental RNase inhibitor polypeptide to a thioredoxin module. Advantage of the engineering strategy in terms of protein structure and function was predicted *in silico*. Under laboratory settings, the yield of purified soluble recombinant product was about 12 mg per 1 L of expression bacterial culture. By RNase inhibition capacity *in vitro*, the product is comparable or superior to a commercial reference. The kinetic data comply with Lineweaver-Burk model.

Keywords: ribonuclease inhibitor, thioredoxin, immobilized metal chelate affinity chromatography, Lineweaver-Burk model

Funding: The study was funded by DNA-Technology LLC.

Author contribution: Sukhov DA, Romanenko GA — protein engineering, expression and purification; Kholoshenko IV, Petrova TV — product characterization, writing; Myshkin MYu — protein structure analysis; Kost VYu — study design; Trofimov DYu — project supervision; Usman NYu — writing; Barsova EV — project coordination, writing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Natalia Yu. Usman
Ostrovityanova 1/1, Moscow, 117997, Russia; n_usman@rambler.ru

Received: 02.09.2024 **Accepted:** 09.10.2024 **Published online:** 28.10.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.043

Особые белки, напрямую ингибирующие клеточные и внеклеточные рибонуклеазы (РНКазы), экспрессируются различными типами клеток, и их физиологический эффект является цитопротекторным [1]. В исследованиях кинетики ингибирования РНКаз такими белками было использовано несколько модельных мишеней, в частности РНКазы А и ангиогенин — секретлируемая РНКазы с низкой каталитической активностью, способствующая васкуляризации [2]. Эксперименты с ангиогенином и ингибитором плацентарной РНКазы выявили двухступенчатый механизм связывания, при котором быстро образуется свободный комплекс двух белков E-I,

постепенно стягивающийся в стабильный комплекс E-I* за счет медленной изомеризации ($k_2 = 97 \text{ c}^{-1}$) [3].

Ингибиторы РНКазы давно используют в биотехнологии и лабораторной диагностике. От эффективности ингибирования РНКаз зависит точность аналитических методов, основанных на обратной транскрипции, что подтверждается опытом диагностики коронавирусной инфекции в период пандемии SARS-CoV2 [4]. Масштабное производство рекомбинантных ингибиторов РНКазы в бактериальных системах осложняется редокс-чувствительностью этих белков [5], также ухудшающей стабильность при хранении.

Небольшие белки тиоредоксины (Trx), обнаруженные во всех живых клетках, участвуют в окислительно-восстановительном контроле благодаря способности удерживать электроны цистеиновых остатков в своем активном центре. Поглощая поток электронов от НАДФ-Н (катализируемый Trx-редуктазой), Trx стабилизируют активированные тиолатные группы в различных клеточных белках, тем самым защищая их нативное, активное состояние [6]. В белковой инженерии использование Trx в качестве ковалентно связанного шаперона может существенно улучшить выходы редокс-чувствительного рекомбинантного продукта, не ухудшая его свойств; общая выгода будет зависеть от особенностей экспрессионной системы и целевого продукта. Добавление Trx в качестве домена слияния может эффективно предупреждать неправильную трехмерную укладку целевого продукта в *E. coli* и его переход в неактивную, нерастворимую форму, накапливающуюся в виде тел включения. Транскрипты Trx *E. coli* хорошо транслируются в аутентичных средах, что обеспечивает высокий выход химерного продукта; при этом тиоредоксиновый модуль имеет прочную третичную структуру и может быть дополнительно модифицирован для металл-хелатной очистки [7].

Цель работы — получить и охарактеризовать новый рекомбинантный ингибитор РНКаз LoRI, сконструированный на основе полипептида плацентарного ингибитора РНКаз мыши, дополненного тиоредоксиновым модулем для повышения редокс-устойчивости и His-тэгом для высокотехнологичной очистки посредством металл-хелатной аффинной хроматографии (IMAC).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Белковая инженерия

Последовательность ингибитора РНКаз мыши из базы данных UniProt (*M. musculus* Rnh1; Uniprot Q91V17) была дополнена с N-конца тиоредоксиновым модулем (*E. coli* trxA; Uniprot P0AA25) через линкер, содержащий гексагистидиновый тэг (6H), сайт расщепления тромбином (LVPRGS), S-тэг (KETAAAKFERQH) и сайт расщепления энтерокиназой (DDDDK):

MNHKVMHNSDKIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHNNHHSSGLVPRGSGMKETAANKFERQHMDSPDLGTDHDDDKAMSLDIQCEQLSDARWTELLPLIQQYEVRLDDCGLTEVRCCKDISSAVQANPALTELSLRTNELGDGGVGLVQLQNPCTKIQKLSLQNCGLTEAGCGILPGMLRSLSTLRELHLNDNPMGDAGLKLCEGLQDPQCRLEKLLQLEYCNLTATSCEPLASVLRVKADFKELVLSNNDLHEPGVRILCQGLKDSACQLESCLKENCGITANCKDLCDVWASKASLQELDSSNKLGNAGIAALCPGLLLPCKLRLTLVWVWECDAEGCKDLORVLRKQSLKELSLASNELKDEGARLLCESLLEPGCQLESWLKTCSLTAASC PYFCSVLTKSRSLLELQMSNNPLGDEGVQELCKALSQPDTVLRLEWLGDGCDVTNSGCSLANVLLANRSLRELDSLNNCMGGPGVQLQLESCLKQPSCTLQQLVLDIYWTNEVEEQLRALAEERPSLRIS*

В исследовании *in silico* была использована модель для предсказания структуры белков AlphaFold 3 [8].

Молекулярное клонирование и бактериальная экспрессионная система

Кодон-оптимизацию для *E. coli* проводили с учетом частоты встречаемости кодонов у данного организма (NCBI GenBank, Codon Usage Database). Дополнительно корректировали последовательность гена вручную (без

использования специального программного обеспечения): в структуре минимизировали количество GC-богатых участков, сохраняя идентичность аминокислот. Синтез нуклеотидной последовательности *de novo* был выполнен методом сборки с частично перекрывающимися олигонуклеотидами и последующей амплификацией, в качестве услуги от компании Евроген (Москва, Россия), по авторскому протоколу (Фрадков А. Ф., 2021).

Кодон-оптимизированную ДНК-матрицу trxA-6H-Rnh1 клонировали в плазмиду pET32 (Pharmacia). Конструкцию верифицировали секвенированием по Сэнгеру. Для усиления экспрессии активного рекомбинантного белка в системе *E. coli* электрокомпетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) трансформировали вспомогательной плазмидой pGro7 (Takara Bio), кодирующей шаперон GroEL-ES, как рекомендовано для рекомбинантных продуктов, богатых цистеином [9]. Полученный штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)-pGro7 трансформировали конструкцией pET32-trxA-6H-Rnh1.

Бактериальная культура

Штамм-продуцент *BL21(DE3)-pGro7*, трансформированный конструкцией pET32-trxA-6H-Rnh1, выращивали в течение ночи при 37 °C в среде LB, содержащей NaCl (10 г/л), триптон (10 г/л) и дрожжевой экстракт (5 г/л), с добавлением ампициллина и хлорамфеникола в конечных концентрациях 100 мкг/мл и 30 мкг/мл соответственно. Затем культуру пересевали в свежую порцию среды LB с антибиотиками и инкубировали в шейкере (225 об/мин) при 37 °C в течение ночи. На следующий день предварительную культуру разбавляли средой LB, дополненной 2,5 мМ MgCl₂, и выращивали в биореакторе F25L (БИОТЕХНО; Россия) при 37 °C, 400 об./мин, 0,6 бар и 0,25 м³/ч до экспоненциальной фазы, определяемой как OD₆₀₀ = 0,5. Далее культуру индуцировали 1 г/л арабинозы для активации генов шаперонов и оставляли расти при 37 °C до OD₆₀₀ = 0,9. Затем температуру снижали до 20 °C, и культуру индуцировали изопропил β-d-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) в конечной концентрации 1 мМ. Через 20 ч после индукции клетки собирали центрифугированием при 4500 об./мин в центрифуге Beckman Coulter Avanti™ J-15R, оснащенной ротором Beckman Coulter Avanti™ JS-4.750 (Beckman Coulter; США).

Выделение белка

Биомассу бактерий (50 г), экспрессирующих целевой рекомбинантный продукт, ресуспендировали в 10-кратном объеме буферного раствора Ni-A (500 мМ NaCl, 20 мМ Tris-Cl, 10 мМ имидазола (ImH), 0,1% Твин 20, 10 мМ 2-меркаптоэтанол (2-bme); pH 7,6) с 1 мМ PMSF. Лизис проводили с использованием ультразвукового гомогенизатора Q500 (Qsonica; США) при амплитуде 60, импульс вкл./выкл. 05/05 с в течение 10 мин на льду. Лизат осветляли в центрифуге HERMLE Z-36HK, оснащенной ротором HERMLE 12/035 (HERMLE Labortechnik GmbH; Германия), при 21 000 об./мин в течение 40 мин. Для осаждения растворимых белков очищенный лизат дополняли 15% w/w (NH₄)₂SO₄ и центрифугировали в HERMLE Z-36HK с ротором HERMLE 12/035 при 21 000 об./мин в течение 10 мин, затем дополняли 10% w/w (NH₄)₂SO₄ и центрифугировали в том же режиме. Осадок растворяли в пятикратном объеме Ni-A; раствор пропускали через полиэфирсульфонный мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм (Vacuum Filtration „rapid“-Filtermax; TPP; Швейцария).

Хроматография

Отфильтрованный продукт наносили на хроматографическую колонку (Cytiva; США) с наполнителем Ni-INDIGO (Cube Biotech GmbH; Германия). Объем колонки (CV, 20 мл) предварительно уравнивали 15 CV буфера Ni-A со скоростью 5 мл/мин, продукт наносили со скоростью 4 мл/мин. Загруженную колонку промывали 10 CV буфера Ni-A. Для элюирования использовали 5 CV 0,5X буфера Ni-B и 5 CV 1X буфера Ni-B (500 мМ NaCl, 20 мМ Tris-Cl, 500 мМ ImH, 0,1% Твин 20, 10 мМ 2-bme; pH 7,6) (рис. 1).

Элюат анализировали электрофорезом в 10%-м полиакриламидном геле с SDS (SDS-PAGE; рис. 2). Фракции, содержащие рекомбинантный целевой продукт, объединяли и диализовали в буфере Q-A (20 мМ Tris-Cl, 120 мМ KCl, 0,1% Твин 20, 10 мМ 2-bme; pH 7,2) при соотношении объемов 1 : 40 в течение 12 ч.

Для высокоэффективной анионообменной хроматографии II использовали колонку HiScale™ 16/10, заполненную Q Sepharose Fast Flow (CV = 10 мл; Cytiva, США), предварительно уравниваемую 15 CV буфера Q-A. Отфильтрованный диализат наносили на колонку со скоростью 3 мл/мин (рис. S1). После нанесения колонку промывали 10 CV буфера Q-A. Продукт элюировали 20 CV 0–15% буфера Q-B (20 мМ Tris-Cl, 1 М KCl, 0,1% Твин 20, 10 мМ 2-bme; pH 7,2).

Фракции, содержащие рекомбинантный продукт, определяли с помощью SDS-PAGE (7–26; рис. S2), объединяли и диализовали в буфере хранения (50 мМ KCl, 20 мМ Нерес-К, 0,1% Твин 20, 8 мМ дитиотреитол, 50% глицерин; pH 7,2), 1 : 40 по объему, в течение 12 ч. После диализа концентрацию и чистоту продукта оценивали спектрофотометрически по Бредфорду и методом SDS-PAGE с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта (рис. S3). Полученный стоковый раствор продукта разбавляли буфером хранения (pH = 7,0) до 1 мг/мл (15,75 мкМ), аликвотировали и хранили при температуре –25...–18 °С.

Коммерческий эталон активности

Thermo Scientific™ RiboLock RNase Inhibitor 40 U/μL (#EO0381) был выбран в качестве эталона активности ингибитора РНКаз. Молекулярная масса белка (49,6 кДа)

указана в данных производителя. Концентрацию белка в поставляемых аликвотах, 1 мг/мл (20,16 мкМ), измеряли методом Бредфорда.

РНК-субстраты

В качестве субстратов были использованы два типа РНК-препаратов: 1) суммарная РНК человека, выделенная из клеточных культур HEK 293 с использованием реагента ExtractRNA (Евроген; Россия); 2) синтетическая одноцепочечная РНК (1,7 кб), полученная методом транскрипции *in vitro* с использованием набора HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB #E2040S). Концентрации РНК измеряли в приборе NanoDrop™ 2000/2000с при коэффициентах поглощения 260/280 и 260/230; целостность РНК подтверждали электрофорезом.

Анализ стабильности РНК

Активность ингибитора РНКаз оценивали по степени деградации РНК в присутствии РНКазы А.

РНКазы Monarch® RNase A 20 мг/мл (NEB #T3018L) была выбрана в качестве модельной мишени для ингибирующего связывания. Рабочий раствор мишени получали разбавлением исходного раствора чистой деионизированной водой до 5 нг/мкл. Активность ингибирования РНКаз измеряется в единицах: одна единица соответствует количеству агента, способного снизить активность 5 нг РНКазы А до 50% от исходного значения.

Реакции проводили в объеме 10 мкл с 0,3–1,0 мкг суммарной РНК человека, 2,5–5,0 нг РНКазы А и 0,0–4,0 мкг ингибитора (LoRI или RiboLock) в буфере (10 мМ TrisHCl, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, pH 8,0 при 25 °С). В ходе приготовления реакционных смесей ингибитор и РНКазу смешивали друг с другом и затем добавляли к РНК. Реакционные смеси инкубировали при различных условиях, базово при 37 °С в течение 30 мин, и анализировали электрофорезом в 1,2%-м агарозном геле. Каталитическое расщепление РНКазой А останавливали добавлением 2-bme до 0,5 М; образцы помещали на лед или замораживали. Перед электрофорезом образцы смешивали с буфером для нанесения (#PB020; Евроген, Россия). Для обратной транскрипции аликвоты отбирали до добавления 2-bme и немедленно анализировали.

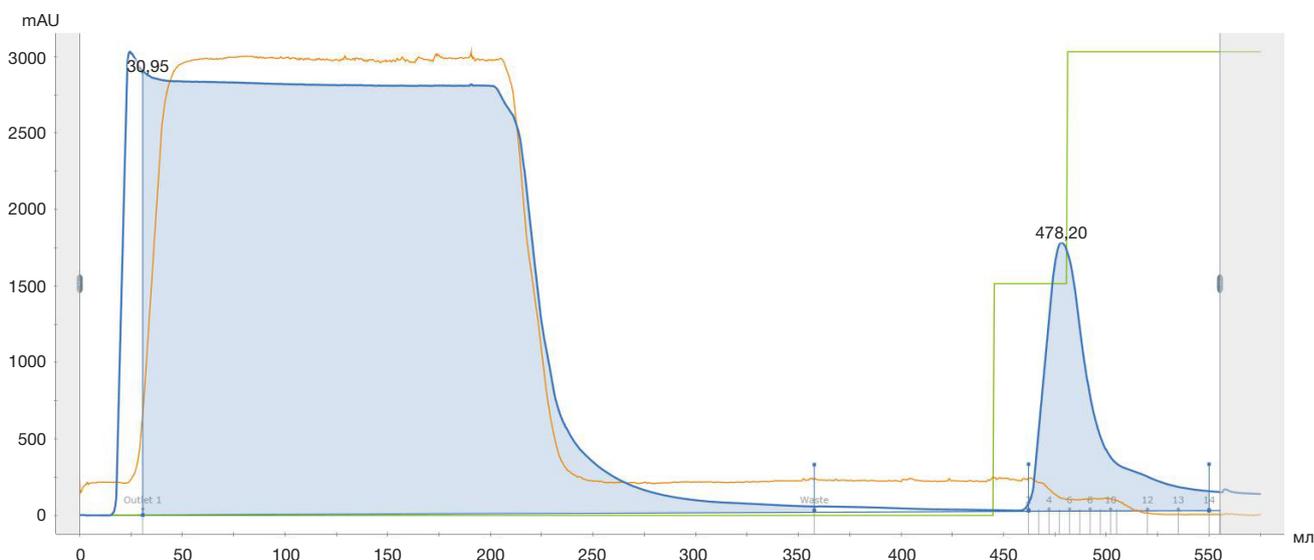


Рис. 1. Профиль хроматографии I (IMAC на Ni-INDIGO, Cube Biotech)

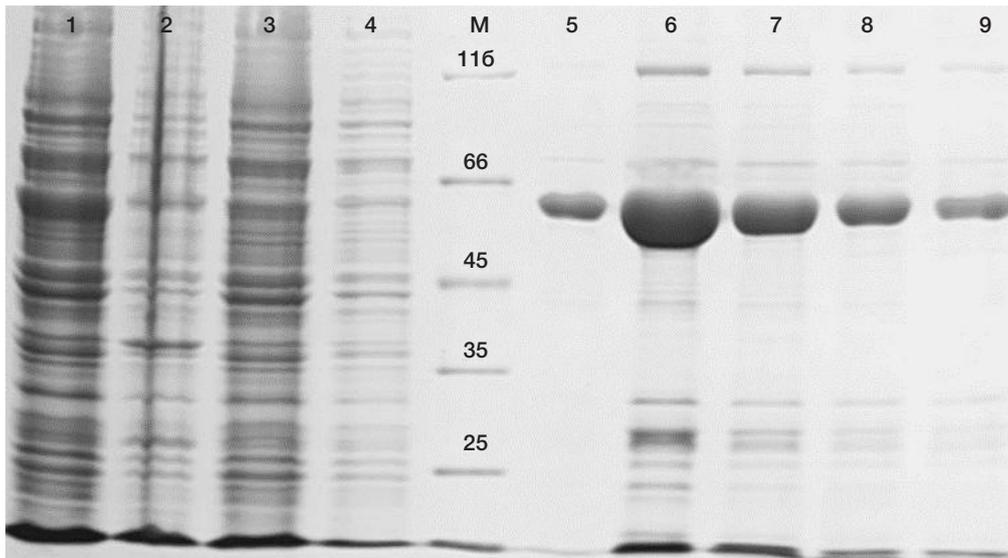


Рис. 2. Образцы хроматографии I, 10% SDS-PAGE. Дорожки: 1 — супернатант; 2 — нерастворимый остаток; 3 — проскок; 4 — промывка; M — маркер молекулярной массы белка со значениями полос, кДа; 5–9 — элюат, фракции 2, 5, 8, 10 и 11 соответственно

Флуориметрия

Для мониторинга стабильности РНК использовали флуоресцентный краситель Ribo488 (код продукта 11510; Lumiprobe, Россия). Кинетические кривые деградации РНК строили на микропланшетном считывателе CLARIOstar® Plus (BMG LABTECH; Германия) в режиме ферментативной кинетики AMC.

Для определения специфической активности ингибитора использовали краситель QuDye ssDNA (код продукта 17102; Lumiprobe, Россия). Реагент инкубировали с синтетической одноцепочечной РНК в присутствии 2,5 нг РНКазы А и 0,5–4,0 мкг ингибитора в объеме 40 мкл при 37 °С в течение 1 ч. Измерения проводили на микропланшетном считывателе Hidex Sense 425-311 (HIDEX; Финляндия).

В кинетическом исследовании использовали суммарную РНК человека и краситель QuDye ssDNA. Смеси готовили с использованием 10X реакционного буфера (300 мМ TrisHCl, 50 мМ MgCl₂, 500 мМ KCl; pH 7,9–8,0 при 25 °С) и варьирующих количеств РНК (150, 300, 600 нг) и LoRI (1, 0,9, 0,8 мкг — соответственно, 197, 177, 157 нМ в объеме реакции 80 мкл). Измерения проводили на CLARIOstar® Plus. Коммерческий эталон активности ингибитора РНКаз Thermo Fisher™ RiboLock использовали в конечной концентрации 252 нМ. В качестве мишени использовали РНКазу А (5 нг на реакцию); серия включала в себя контрольные постановки без РНКазы и без ингибитора.

ПЦР-тесты

Для количественного определения РНК методом ПЦР с обратной транскрипцией использовали наборы OneTube RT-PCR TaqMan (#SK031; Евроген, Россия) с праймерами, фланкирующими 130 п. н. фрагмент кДНК B2M, (5'-ATTATAACCCTACATTTTGTGC, 5'-TGTAAGCAGCATCATGGAGGTT, по 0,2 мкМ каждого) и зондом TaqMan, покрывающим стык экзонов для исключения неспецифического сигнала от остаточной геномной ДНК (5'-FAM-GCCGCATTTGGATTGGATGAATCCCA-BHQ1, 0,1 мкМ).

В тестах на (не)ингибирование ПЦР (ПЦР-нейтральность) использовали готовую смесь компонентов ПЦР 5X qPCRmix-HS PCR (#PK145; Евроген, Россия) с системой FAM-BHQ1 TaqMan. Фрагмент гена GAPDH размером 90 п. н.

был амплифицирован с 100 пг человеческой геномной ДНК в объеме реакции 25 мкл. Тесты проводили в приборе для ПЦР в реальном времени BioRad CFX 96 (BioRad; США) в пяти технических повторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структурное исследование *in silico*

Немодифицированный ингибитор РНКаз Rnh1 содержит несколько структурных мотивов, обозначаемых как «повторы, богатые лейцином», и в активной форме напоминает подкову, высланную отрицательно заряженными остатками. На рис. 3А показан комплекс Rnh1 с РНКазой А (RibA) — небольшим белком из ~120 аминокислот, стабилизированным четырьмя дисульфидными связями. Во взаимодействии участвует С-концевая область ингибитора, в частности, позиции V405, V428, Y430, D431, Y433 и E436 [10]. Механизм ингибирования основан на стерическом затруднении доступа к активному сайту в RibA. N-концевая область ингибитора не участвует во взаимодействии и является благоприятным местом для точки слияния в химерном белке (тем более, С-концевое положение исключило бы Trx как *цис*-шаперонный модуль, который должен быть уже на месте к моменту синтеза Rnh1). Кроме того, согласно результатам моделирования, помещение His-тэга на С-конце Rnh1 препятствует ингибирующему связыванию (рис. 3В), что в итоге и определило стратегию инженерии.

На рис. 4А представлен химерный белок Trx::Rnh1 с двумя компактными функциональными модулями, предсказанными с высокой точностью, соединенными рыхлым неупорядоченным линкером. Моделирование комплекса Trx::Rnh1/RibA в AlphaFold3 демонстрирует сближение участков Trx и RibA при взаимодействии с РНКазой (рис. 4В).

Таким образом, модуль Trx может стабилизировать комплекс, «прижимая» RibA к ингибитору; данный эффект поддерживается отрицательным поверхностным потенциалом на Trx. Суммарный заряд модуля Trx оценивается как –4, тогда как молекула РНКазы имеет суммарный заряд +4 и электростатически положительную поверхность (для притяжения РНК), за исключением

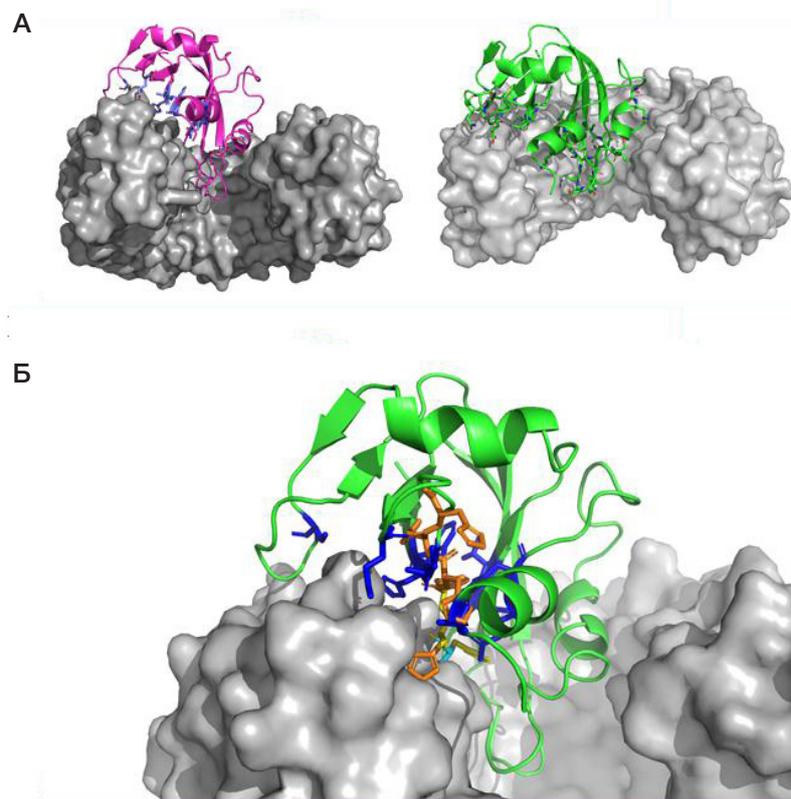


Рис. 3. Рибонуклеаза А (RibA) взаимодействует с коровым ингибитором Rnh1 (серая поверхность). **А.** Фермент контактирует с ингибитором своей лиганд-связывающей бороздкой; остатки, образующие активный центр, выделены цветом (PDB id: 1DFJ) [10]. **Б.** Увеличенное изображение С-конца Rnh1 в тесном контакте с остатками активного центра РНКазы (показано синим), стерически препятствующем связыванию РНК. С-концевой His-тэг (показано оранжевым) нарушает взаимодействие, «врезаясь» в RibA; наложение модели ингибитора с His-тэгом на С-конце и кристаллической структуры комплекса Rnh1/RibA в AlphaFold3 (PDB id: 1DFJ)

одного кластера отрицательно заряженных остатков. Помимо этого, Trx модуль может сам по себе действовать как фермент, размыкая доступные дисульфиды в молекуле рибонуклеазы, находящейся в комплексе с ингибитором, и тем самым нарушая ее структуру (рис. S4).

Выходы продукта

Добавление модуля Trx позволило повысить продукцию растворимого рекомбинантного белка в 3–5 раз по сравнению с немодифицированной последовательностью Rnh1. Выходы составили около 2,7–3 мг целевого белка на 1 г биомассы *E. coli*. После всех этапов очистки потери белка составили приблизительно 25–30%. Выход очищенного продукта в лабораторных условиях составил 2 мг на 1 г биомассы *E. coli* или около 12 мг на 1 л экспрессионной культуры.

Анализ стабильности РНК

Пилотные испытания с использованием 1 мкг суммарной РНК человека в сочетании с 5 нг РНКазы А и 1 мкг LoRI в реакционном объеме 10 мкл выявили превосходные защитные свойства продукта по отношению к РНК (рис. 5).

Эффективный температурный диапазон ингибирования определяли с использованием температурного градиента 40–57 °С, запрограммированного в термоблоке. В постановке использовали 1 мкг общей человеческой РНК, объединенной с 2,5 нг РНКазы А и 2 мкг LoRI в объеме реакции 10 мкл. Для сравнения идентично приготовленные смеси суммарной РНК с LoRI инкубировали в течение 30 мин в том же диапазоне фиксированных температур

без добавления РНКазы. После 30-минутной инкубации отбирали по 1 мкл для ПЦР-анализа целостности РНК, запускавшегося немедленно (рис. 6). Оставшиеся объемы реакций обрабатывали 2-bme и анализировали электрофорезом (рис. 7, рис. S5).

Как показало варьирование параметров реакции, LoRI эффективно защищает РНК от каталитического расщепления при температурах до 46,6 °С; дальнейшее увеличение температуры приводит к частичной деградации РНК (рис. S6–S14). При 54,1 °С электрофореграммы показывают диффузно распределенный материал, смещенный в область с низкой молекулярной массой (рис. 7, дорожка 4), в то время как Ct увеличивается на три цикла, что соответствует уменьшению эффективной концентрации матрицы размером 130 п. н. на один порядок величины (рис. 6). При 57,0 °С защитные свойства LoRI являются остаточными: электрофореграммы показывают полную деградацию образца РНК с ΔCt , достигающей семи циклов по сравнению с исходным значением.

ПЦР-нейтральность

Полученные данные указывают на отсутствие изменений в эффективности ПЦР в присутствии до 4,0 мкг LoRI в объеме реакции 25 мкл (рис. S15).

Анализ специфической активности

Калибровочная кривая для анализа показана на рис. S16. Учитывая диапазон линейного отклика 0,1–0,6 мкг, все измерения проводили с 1,0 мкг РНК для повышения точности графика кинетики ингибирования в сравнении

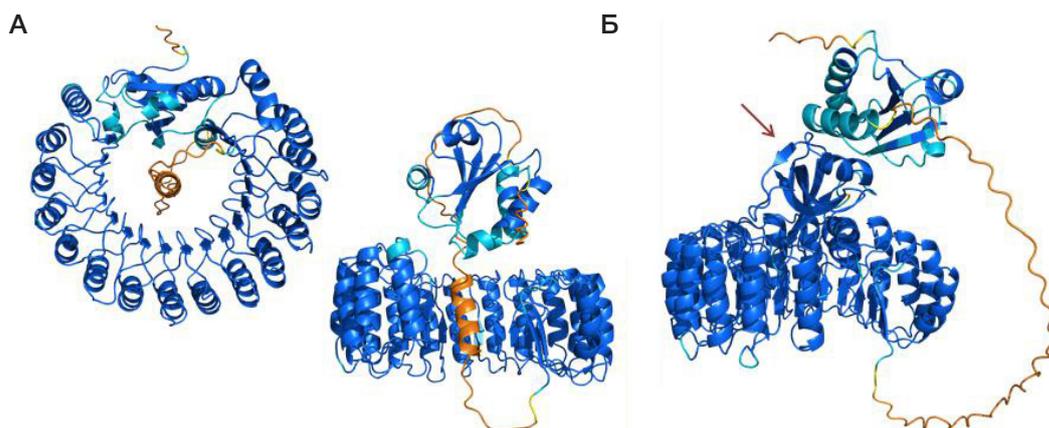


Рис. 4. Структурное моделирование химерного ингибитора Ttx::Rnh1 в AlphaFold3. **А.** Нативный и несвязанный продукт, состоящий из подковообразного корового ингибитора, соединенного линкером с компактным Ttx. Цветовая схема соответствует индексу достоверности модели из расчета на аминокислотный остаток: pLDDT > 90 (синий), моделирование с высокой степенью точности; pLDDT 70–90 (светло-голубой), высокая точность для основной цепи; pLDDT 50–70 (желтый) представление нестабильной структуры с низкой степенью точности; pLDDT < 50 (оранжевый), неупорядоченная область. Соответственно, функциональные модули Rnh1 и Ttx отображены с высокой точностью, тогда как представление линкера является условным: он может быть ориентирован и расположен по-разному, например, снаружи подковы. **Б.** Рибонуклеаза А (показана стрелкой), взаимодействующая с химерным ингибитором, выглядит зажатой между модулями Ttx и Rnh1

с коммерческим эталоном Thermo Fisher™ RiboLock (40 U/мкл ~ 1 мкг/мкл). Измерения флуоресценции для избытка ингибитора были приняты за 100%. На основании полученных данных установлено, что 1 мкг LoRI соответствует 50 U активности (рис. S17).

Сравнительное кинетическое исследование

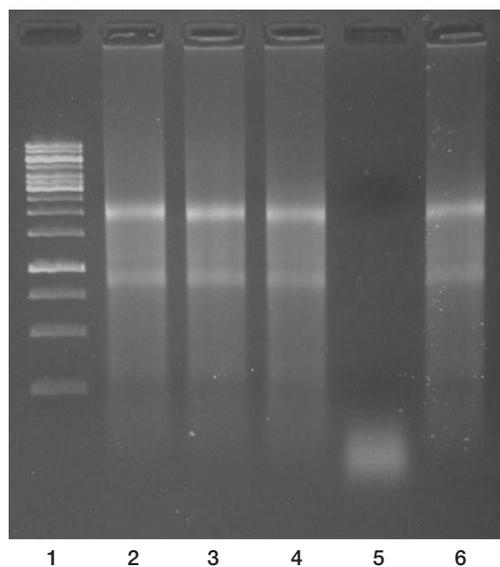
Графическая модель Лайнуивера–Берка, предполагающая смешанный механизм ингибирования РНКазы, представлена на рис. S18.

Значение константы ингибирования K_i , определенное методом графического представления, согласуется с расчетными данными для модели смешанного ингибирования [11]. Расчетная константа ингибирования

для LoRI по отношению к РНКазе А составила 0,825 пМ. Подход был далее применен аналогичным образом для расчета константы ингибирования Thermo Fisher™ RiboLock, составившей 1,199 пМ. Согласно полученным данным, LoRI превосходит коммерческий эталон по ингибирующей способности благодаря образованию более устойчивого комплекса с ферментом-мишенью.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование было направлено на разработку ингибитора РНКазы для использования в прецизионной молекулярной медицине, в частности, в диагностических тест-системах на основе ПЦР с обратной транскрипцией и при подготовке библиотек для РНК-секвенирования. Предложенная



	2	3	4	5	6
РНКазы А	–	–	5 нг	5 нг	5 нг
LoRI		1 мкг	1 мкг	–	–
Thermo Scientific™ RiboLock	–	–	–	–	1 мкг

Рис. 5. Анализ стабильности РНК, пилотный эксперимент. Дорожка 1: маркер длин Thermo Scientific™ GeneRuler 1kb DNA Ladder. Дорожки 2–6: 1 мкг РНК + Обработка проведена при температуре 37 °С в течение 30 мин

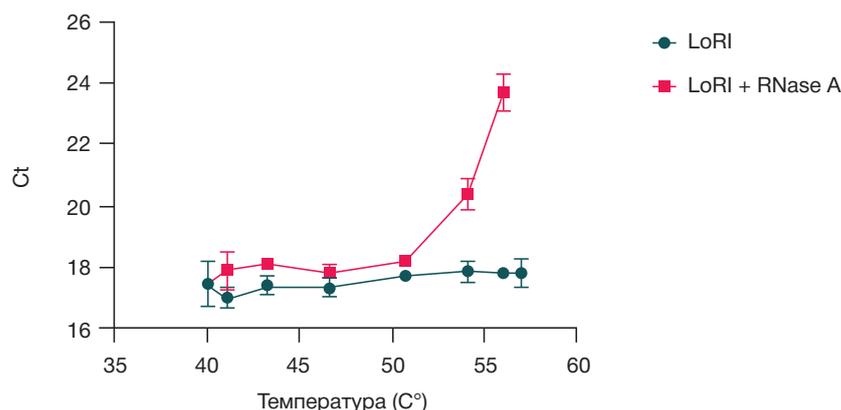


Рис. 6. Данные ПЦР с обратной транскрипцией для анализа стабильности РНК при 40–57 °С с использованием 1 мкг РНК + 2 мкг LoRI с РНКазой А (2,5 нг) или без нее; время обработки — 30 мин

стратегия линейного добавления тиоредоксинового модуля в сочетании с His-тэгом оказалась успешной. Продукт предназначен для широкого спектра исследовательских и диагностических приложений.

Растущий спрос на эффективные ингибиторы РНКаз молекулярно-биологического уровня качества связан с текущим интересом к РНК как ключевому носителю информации в молекулярной медицине и связанной с ней медицинской биотехнологии. Плацентарный ингибитор РНКаз Rnh1 — идеальный прототип агента, обеспечивающего сохранность РНК, выделенной из клеточных культур или тканей. Основным препятствием для его промышленного производства является редокс-чувствительность: этот богатый лейциновыми повторами белок содержит около 30 остатков цистеина на молекулу. В нативном ингибиторе все цистеины должны сохранять восстановленную форму в виде SH-групп и не вступать в образование дисульфидных связей внутри молекулы [12]. Пространственная укладка рекомбинантного немодифицированного полипептида Rnh1 в *E. coli* может быть нарушена в силу особенностей окислительно-восстановительной среды, субоптимальных параметров синтеза и отсутствия аутентичных шаперонов. Неправильно фолдированный рекомбинантный белок имеет тенденцию к необратимой секвестрации в тела включения. Был успешно экспрессирован ген ингибитора

РНКаз свиньи в *E. coli* с использованием промотора *trp* и минимальной питательной среды. После аффинной хроматографии с иммобилизованной РНКазой А выходы составили ~10 мг очищенного активного продукта на 1 л культуры [13]. Еще одной исторической альтернативой стало выделение ингибитора из тканей животных; выходы составили ~6 мг ингибитора на 1 кг сырой печени с использованием аффинной хроматографии на колонках с иммобилизованной РНКазой и доочистки методом анионообменной хроматографии [14]. В настоящее время аффинная хроматография на РНКазе не используется из-за высокой себестоимости и рисков загрязнения конечного продукта (ингибитора) следами РНКазной активности.

ВЫВОДЫ

Использование модуля Trx в качестве внутримолекулярного шаперона в бактериальной системе экспрессии позволило получить высокие выходы рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз на основе прототипа млекопитающих в растворимой активной форме после очистки с помощью ИМАС. Продукт демонстрирует превосходные свойства сохранения целостности препаратов РНК в широком диапазоне условий, актуальных для молекулярных исследований и лабораторной диагностики.

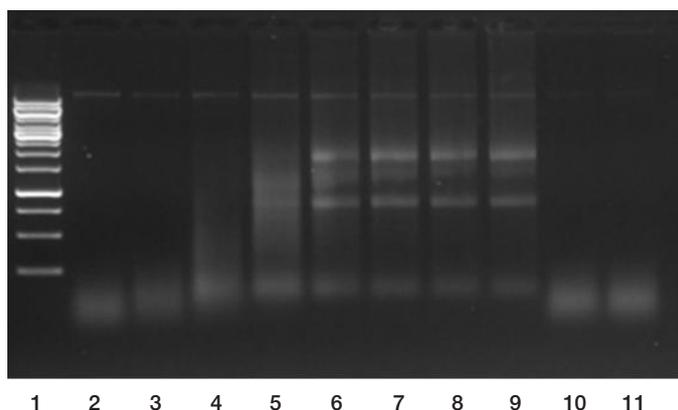


Рис. 7. Анализ стабильности РНК при 40–57 °С, время обработки — 30 мин. Дорожка 1: маркер длин Thermo Scientific™ GeneRuler 1kb DNA Ladder. Дорожки 2–9: 1 мкг РНК + 2,5 нг РНКазы А + 2 мкг LoRI при

2	3	4	5	6	7	8	9
57,0 °С	56,0 °С	54,1 °С	50,7 °С	46,6 °С	43,3 °С	41,1 °С	40,0 °С

Дорожки 10–11: 1 мкг РНК + 2,5 нг РНКазы А без добавления ингибитора, инкубация при 57,0 и 40,0 °С соответственно

Литература

1. Thomas SP, Kim E, Kim JS, Raines RT. Knockout of the ribonuclease inhibitor gene leaves human cells vulnerable to secretory ribonucleases. *Biochemistry*. 2016; 55 (46): 6359–62. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b01003.
2. Abel RL, Haigis MC, Park C, Raines RT. Fluorescence assay for the binding of ribonuclease A to the ribonuclease inhibitor protein. *Anal Biochem*. 2002; 306 (1): 100–07. DOI: 10.1006/abio.2002.5678.
3. Lee FS, Shapiro R, Vallee BL. Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor [published correction appears in *Biochemistry* 1989 Mar 7; 28 (5): 2354]. *Biochemistry*. 1989; 28 (1): 225–30. DOI: 10.1021/bi00427a031.
4. Nishibata Y, Koshimoto S, Ogaki K, Ishikawa E, Wada K, Yoshinari M, Ishizu A. RNase in the saliva can affect the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 by real-time one-step polymerase chain reaction using saliva samples. *Pathol Res Pract*. 2021; 220: 153381. DOI: 10.1016/j.prp.2021.153381.
5. Šiurkus J, Neubauer P. Heterologous production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by redox state control and chaperonin coexpression. *Microb Cell Fact*. 2011; 10: 65. DOI: 10.1186/1475-2859-10-65.
6. Lee S, Kim SM, Lee RT. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18 (10): 1165–207. DOI: 10.1089/ars.2011.4322.
7. LaVallie ER, Lu Z, Diblasio-Smith EA, Collins-Racie LA, McCoy JM. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*. 2000; 326: 322–40. DOI: 10.1016/s0076-6879(00)26063-1.
8. Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024; 630: 493–500 DOI: 10.1038/s41586-024-07487-w.
9. Kyratsous CA, Silverstein SJ, DeLong CR, Panagiotidis CA. Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Gene*. 2009; 440 (1–2): 9–15. DOI: 10.1016/j.gene.2009.03.011.
10. Kobe B, Deisenhofer J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*. 1995; 374 (6518): 183–6. DOI: 10.1038/374183a0.
11. Dixon M, Webb EC. *Enzymes*. 2nd Edition. New York: Academic Press, 1964.
12. Fominaya JM, Hofsteenge J. Inactivation of ribonuclease inhibitor by thiol-disulfide exchange. *J Biol Chem*. 1992; 267 (34): 24655–60.
13. Klink TA, Vicentini AM, Hofsteenge J, Raines RT. High-level soluble production and characterization of porcine ribonuclease inhibitor. *Protein Expr Purif*. 2001; 22 (2): 174–9. DOI: 10.1006/prep.2001.1422.
14. Dickson KA, Haigis MC, Raines RT. Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2005; 80: 349–74. DOI: 10.1016/S0079-6603(05)80009-1.

References

1. Thomas SP, Kim E, Kim JS, Raines RT. Knockout of the ribonuclease inhibitor gene leaves human cells vulnerable to secretory ribonucleases. *Biochemistry*. 2016; 55 (46): 6359–62. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b01003.
2. Abel RL, Haigis MC, Park C, Raines RT. Fluorescence assay for the binding of ribonuclease A to the ribonuclease inhibitor protein. *Anal Biochem*. 2002; 306 (1): 100–07. DOI: 10.1006/abio.2002.5678.
3. Lee FS, Shapiro R, Vallee BL. Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor [published correction appears in *Biochemistry* 1989 Mar 7; 28 (5): 2354]. *Biochemistry*. 1989; 28 (1): 225–30. DOI: 10.1021/bi00427a031.
4. Nishibata Y, Koshimoto S, Ogaki K, Ishikawa E, Wada K, Yoshinari M, Ishizu A. RNase in the saliva can affect the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 by real-time one-step polymerase chain reaction using saliva samples. *Pathol Res Pract*. 2021; 220: 153381. DOI: 10.1016/j.prp.2021.153381.
5. Šiurkus J, Neubauer P. Heterologous production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by redox state control and chaperonin coexpression. *Microb Cell Fact*. 2011; 10: 65. DOI: 10.1186/1475-2859-10-65.
6. Lee S, Kim SM, Lee RT. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18 (10): 1165–207. DOI: 10.1089/ars.2011.4322.
7. LaVallie ER, Lu Z, Diblasio-Smith EA, Collins-Racie LA, McCoy JM. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*. 2000; 326: 322–40. DOI: 10.1016/s0076-6879(00)26063-1.
8. Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024; 630: 493–500 DOI: 10.1038/s41586-024-07487-w.
9. Kyratsous CA, Silverstein SJ, DeLong CR, Panagiotidis CA. Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Gene*. 2009; 440 (1–2): 9–15. DOI: 10.1016/j.gene.2009.03.011.
10. Kobe B, Deisenhofer J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*. 1995; 374 (6518): 183–6. DOI: 10.1038/374183a0.
11. Dixon M, Webb EC. *Enzymes*. 2nd Edition. New York: Academic Press, 1964.
12. Fominaya JM, Hofsteenge J. Inactivation of ribonuclease inhibitor by thiol-disulfide exchange. *J Biol Chem*. 1992; 267 (34): 24655–60.
13. Klink TA, Vicentini AM, Hofsteenge J, Raines RT. High-level soluble production and characterization of porcine ribonuclease inhibitor. *Protein Expr Purif*. 2001; 22 (2): 174–9. DOI: 10.1006/prep.2001.1422.
14. Dickson KA, Haigis MC, Raines RT. Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2005; 80: 349–74. DOI: 10.1016/S0079-6603(05)80009-1.

НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИОННЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БИОМАРКЕРОВ РАБОЧЕЙ ПАМЯТИ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ МОЗГА

В. Ф. Фокин , Н. В. Пономарева, Р. Н. Коновалов, Р. Б. Медведев, А. И. Боровова, О. В. Лагода, М. В. Кротенкова, М. М. Танашян

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Вербальная рабочая память (ВРП) — фундаментальная функция, ответственная за временное хранение и краткосрочную работу с вербальной информацией. Целью работы было определить биомаркер рабочей памяти, связанный с нейровизуализацией источника сверхмедленной электрической активности у больных с хронической ишемией мозга (ХИМ). В исследовании приняли участие 50 пациентов с ХИМ: 16 мужчин и 34 женщины в возрасте 50–85 лет. ВРП оценивали по тесту Лурия. Испытуемые были разделены на две группы, не различающиеся по возрасту, с ВРП ниже и выше среднего уровня в исследованной выборке. Регистрировалась сверхмедленная, менее 0,1 Гц, электрическая активность, иначе называемая уровнем постоянного потенциала (УПП) головного мозга в пяти монополярных отведениях: лобном, центральном, затылочном, правом и левом височных. С помощью фМРТ покоя анализировали области мозга с активированным BOLD (blood-oxygen-level-dependent) сигналом и связанные с областями мозга, ответственными за ВРП и за источники генерации УПП, регистрируемые неполяризуемыми электродами. В двух группах ВРП найдены различия в активации BOLD-сигнала и амплитуде сверхмедленной активности. Эти нейросети покоя, ВРП и нейросеть, ответственная за генерацию УПП, пересекаются в лобных областях. УПП в лобном отведении достоверно различался в двух группах ВРП ($p = 0,00004$). Биомаркером ВРП у больных ХИМ является сверхмедленная активность, регистрируемая в лобном отведении и генерируемая тем участком нейросети, который является пересечением сети ВРП и участка мозга, ответственного за генерацию УПП в лобной области.

Ключевые слова: хроническая ишемия мозга; вербальная рабочая память, фМРТ покоя, сверхмедленная электрическая активность, уровень постоянного потенциала, пересекающиеся нейросети покоя

Финансирование: работа поддержана грантом РФФ №22-15-00448.

Вклад авторов: В. Ф. Фокин — написание статьи; Н. В. Пономарева — дизайн физиологических и нейропсихологических исследований, общий дизайн работы; Р. Н. Коновалов — дизайн нейровизуализационных исследований; Р. Б. Медведев — доплерографические исследования; А. И. Боровова — психофизиологические исследования; О. В. Лагода — клинические исследования; М. В. Кротенкова — руководство нейровизуализационными исследованиями; М. М. Танашян — руководство клиническими исследованиями, общий дизайн работы.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено локальным этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 5-6/22 от 1 июня 2022 г.). Получено информированное согласие всех участников исследования.

✉ **Для корреспонденции:** Виталий Федорович Фокин
Волоколамское шоссе, д. 80, г. Москва, 125367, Россия; fvf@mail.ru

Статья получена: 29.08.2024 **Статья принята к печати:** 16.09.2024 **Опубликована онлайн:** 30.09.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.039

NEUROIMAGING APPROACH TO IDENTIFICATION OF WORKING MEMORY BIOMARKERS IN PATIENTS WITH CHRONIC CEREBRAL ISCHEMIA

Fokin VF , Ponomareva NV, Konovalov RN, Medvedev RB, Boravova AI, Lagoda OV, Krotenkova MV, Tanashyan MM

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Verbal working memory (VWM) is a fundamental function responsible for temporary storage and short-term handling of verbal information. The study was aimed to determine the working memory biomarker associated with imaging of the source of infra-slow electrical activity in patients with chronic cerebral ischemia (CCI). A total of 50 patients with CCI took part in the study: 16 males and 34 females aged 50–85 years. VWM was evaluated by the Luria test. The subjects were divided into two groups matched by age with the VWM below and above the average level for the studied sample. The infra-slow, below 0.1 Hz, electrical activity, otherwise known as the DC potentials (DCPs) of the brain, was recorded with five monopolar leads: frontal, central, occipital, right and left temporal. The resting state fMRI was used to analyze brain regions with the activated BOLD (blood-oxygen-level-dependent) signal that were associated with the brain regions responsible for VWM and the DCP generation sources recorded with the non-polarizable electrodes. The differences in BOLD signal activation and infra-slow activity amplitude were found in two VWM groups. These resting-state neural networks, VWM and the neural network responsible for DCP generation, overlapped in frontal regions. There were significant differences in DCP recorded with the frontal lead in two VWM groups ($p = 0.00004$). In patients with CCI, infra-slow activity, recorded with the frontal lead that is generated by the neural network fragment representing an intersection of the VWM network and the part of the brain responsible for DCP generation in the frontal region, is a VWM biomarker.

Keywords: chronic cerebral ischemia, verbal working memory, resting fMRI, infra-slow electrical activity, DC potential, overlapping resting neural networks

Funding: the study was supported by the RSF grant (No. 22-15-00448).

Author contribution: Fokin VF — manuscript writing; Ponomareva NV — design of physiological and neuropsychological tests, general study design; Konovalov RN — neuroimaging test design; Medvedev RB — Doppler tests; Boravova AI — psychophysiological tests; Lagoda OV — clinical tests; Krotenkova MV — neuroimaging test management; Tanashyan MM — clinical test management, general study design.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (protocol No. 5-6/22 dated 1 June 2022). The informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vitaly F. Fokin
Volokolamskoye shosse 80, Moscow, 125367, Russia; fvf@mail.ru

Received: 29.08.2024 **Accepted:** 16.09.2024 **Published online:** 30.09.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.039

Вербальная рабочая память (ВРП) — это фундаментальная функция, ответственная за временное хранение и краткосрочную работу с вербальной информацией, необходимая для решения ряда задач: рассуждения, понимания, обучения. Выявление биомаркеров ВРП может помочь в понимании индивидуальных различий когнитивных способностей, а также в диагностике и лечении расстройств памяти [1]. Нарушение рабочей памяти может служить также индикатором развития церебрального патологического процесса. Исследования функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) выявили определенные области мозга и сети, участвующие в функционировании ВРП, такие как префронтальная кора, теменная кора, передняя поясная извилина, гиппокамп и др., которые могут варьировать в зависимости от условий оценки ВРП, индивидуальных психофизиологических характеристик и вида заболеваний [2, 3]. Нейротрансмиттеры дофамин и норадреналин в префронтальной коре участвуют в процессах ВРП и зависят от генов, связанных с рецепторами дофамина (например, *DRD2*, *COMT*) и определяют объем и эффективность рабочей памяти [4]. фМРТ и электрофизиологические измерения, выполненные, например, в тестах на Р300, N-back и других, дали представление о нейронной активности, связанной с рабочей памятью и ее емкостью. Структурные характеристики мозга, такие как объем серого вещества или целостность белого вещества в областях, поддерживающих рабочую память: в дорсолатеральной префронтальной коре, передней поясной извилине и других, могут коррелировать с показателями рабочей памяти [5–6]. Объем ВРП сокращается при старении, а также нейродегенеративных и сосудистых заболеваниях, таких как хроническая ишемия мозга (ХИМ) [2].

Широкое использование фМРТ послужило дополнительным источником развития представлений о нейроваскулярной единице (НВЕ) — клеточном комплексе, обеспечивающем взаимодействие между BOLD-сигналом и нейронной активностью. НВЕ включает в себя нейроны, глию, эндотелиальные клетки и некоторые другие элементы [7–8]. Процессы, обеспечивающие рабочую память, приводят к активации НВЕ, благодаря этому наблюдаются повышенная активность BOLD-сигналов, нейронных реакций, а также сдвигов сверхмедленной активности. В русскоязычной литературе сверхмедленная активность употребляется наравне с термином «уровень постоянного потенциала» (УПП). Активная работа нейронов при активации рабочей памяти может приводить к изменению рН в НВЕ и как следствие к динамике разности потенциалов между кровью и ликвором. В норме и в состоянии покоя рН спинномозговой жидкости составляет 7,31–7,34, в артериальной крови слегка более щелочной — 7,35–7,45. Судя по расчетам, использующим уравнение Нернста благодаря разности концентрации водородных ионов (https://www.physiologyweb.com/calculators/hernst_potential_calculator.html), в норме можно наблюдать сдвиг уровня постоянного потенциала на мембране ГЭБ примерно до 9 мВ. Дополнительный сдвиг возможен также за счет разности концентраций других ионов (калия, натрия, хлора). Динамика кислотности меняет сродство гемоглобина к кислороду, тем самым влияя на BOLD-сигнал (эффект Бора) и клеточный ацидоз [9]. Таким образом, сверхмедленная активность милливольтового диапазона отражает в основном сложные энергетические процессы, происходящие в НВЕ, и может служить индикатором состояния ВРП и других церебральных функций,

поскольку нарушения кислотно-основного баланса по обе стороны ГЭБ связаны с изменением функционирования нейронов. Динамика сверхмедленных потенциалов милливольтового диапазона, отражающая энергетические характеристики метаболизма, потенциально может играть роль биомаркера энергетических процессов [10–14]. Связь УПП с нейронной активностью неоднозначна. В норме более высоким значениям УПП соответствует более высокая активность нейронов. При патологии, например при развитии нейродегенеративных и сосудистых заболеваний, УПП имеет тенденцию повышаться из-за увеличения закисления мозга в силу нейродегенеративных и атрофических процессов и сосудистой недостаточности, как это, например, происходит при болезни Альцгеймера [15].

Традиционные биомаркеры ВРП, такие как упомянутые ранее тесты на Р300 или N-back, часто коррелируют с различными характеристиками фМРТ в парадигме задач, когда участники выполняют конкретные когнитивные задания. Эти задачи непосредственно активизируют сети рабочей памяти и обеспечивают прямые измерения когнитивных функций и связанных с ними показателей активности мозга. В то же время фМРТ покоя фиксирует спонтанные колебания активности мозга, когда обследуемые находятся в состоянии покоя, без выполнения конкретных заданий, однако при этом достаточно точно отражают состояние ВРП. Нейросети покоя — это участки мозга, которые проявляют синхронизированную активность в состоянии пассивного бодрствования. Очевидно, что состояние, предшествующее когнитивному заданию, решающим образом влияет на выполнение когнитивных тестов. Нейросети в состоянии покоя могут перекрываться с сетями, связанными с задачами; подобная взаимосвязь играет, очевидно, существенную роль для изучения когнитивных функций с помощью нейросетей покоя, а также для поиска биомаркеров. Представлены доказательства того, что области мозга, обладающие функциональной связностью в состоянии покоя, облегчают передачу информации, связанной с когнитивными задачами, между этими же областями мозга [16]. Авторы этой статьи разработали подход для демонстрации взаимосвязи между топологией сети в состоянии покоя и передачей информации в сетях при выполнении задач. Нейросети покоя могут также перекрываться друг с другом, что отражает некоторую фундаментальную закономерность внутренней организации мозга. Корреляционные связи между областями мозга измеряют статистические отношения (корреляции) между активностью нейронов в различных образованиях мозга и показывают, насколько две области мозга синхронизированы (синфазны или противофазны) в этих областях при разных состояниях мозга. Области мозга, в которых наблюдаются сильные корреляционные связи, по определению относятся к одной и той же нейросети покоя. Теоретически возможно, что нейросети могут существовать в двух разных состояниях, и их размеры будут различны в этих состояниях, возможно также, что нейросети из-за многослойной структуры могут коррелировать с несколькими нейросетями. Значительное перекрытие некоторых нейросетей друг с другом предполагает наличие между ними сильных функциональных связей, отражающих общие функциональные роли и скоординированные модели активности в мозге [17–18].

Цель работы — поиск биомаркера, являющегося частью нейросети ВРП у больных хронической ишемией

мозга. Этот биомаркер должен быть включен по определению в процесс рабочей памяти, что делает его полезным инструментом для решения исследовательских и прикладных задач. Известные в настоящее время биомаркеры рабочей памяти сопоставляются с данными фМРТ в парадигме задач, в настоящее время не найден биомаркер, который мог бы рассматриваться в парадигме фМРТ покоя. Настоящий подход направлен на устранение этого пробела.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовали 50 больных хронической ишемией мозга (ХИМ), 16 мужчин и 34 женщины в возрасте 50–85 лет. Средний возраст в выборках мужчин ($64,3 \pm 2,7$) и женщин ($66,2 \pm 1,5$) статистически достоверно не различался, уровень значимости для различий среди мужчин — $p = 0,78$; для женщин — $p = 0,42$. Все пациенты были правшами.

При ХИМ нарушается мозговой кровоток по магистральным и мелким артериям головы, что может привести к различным нарушениям работы мозга. Заболевание часто развивается в пожилом и старческом возрасте. Обычно это сопровождается атеросклерозом, гипертонией, диабетической ангиопатией и другими патологическими процессами. Критерии включения пациентов в исследование: наличие стадии начальных проявлений и субкомпенсации ХИМ; в отсутствие у пациентов в повседневной жизни необходимости постоянной опеки со стороны окружающих [19–21]. Критерии исключения: деменция выраженностью 1 балл и более по клинически рейтинговой шкале деменции [22], наличие в анамнезе острых нарушений мозгового кровообращения, черепно-мозговых травм, тяжелой сердечной, почечной недостаточности, некомпенсированных нарушений функций щитовидной железы.

Оценка когнитивных функций

Исследовали вербальную рабочую память (ВРП) по тесту Лурия. Тест был модифицирован с учетом возможностей больных ХИМ. Испытуемым предлагалось запомнить 10 несвязанных между собой слов при пятикратном повторении и сразу воспроизводить их. Учитывалось последнее пятое значение правильно воспроизведенных слов.

Регистрировалась сверхмедленная электрическая активность — уровень постоянного потенциала (УПП) головного мозга. УПП у больных с ХИМ измеряли на пятиканальном приборе «Нейроэнергокартограф» («Статокин»; Россия) с помощью неполяризуемых хлорсеребряных электродов. Активные электроды размещали на голове, референтный электрод — на запястье правой руки. Расположение электродов следующее: вдоль сагиттальной линии — нижне-лобное (F), далее называемое лобным, центральное (C), затылочное (O) отведения; парасагиттально — правые и левые височные отведения (Td) и (Ts). Регистрацию проводили после мероприятий, направленных на контроль и радикальное уменьшение электродных артефактов, при практической элиминации потенциалов кожного происхождения. Расположение электродов соответствовало международной схеме 10–20, в круглых скобках приведены стандартные топографические обозначения. Подробнее о регистрации УПП описано ранее [11].

Исследование функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) покоя

Обследуемым проводили фМРТ покоя головного мозга в последовательности T2* для получения BOLD-сигнала на магнитно-резонансном томографе Magnetom Verio (Siemens; Германия) с величиной магнитной индукции 3,0 Тл. Испытуемым предлагали максимально расслабиться, лежать спокойно с закрытыми глазами (для исключения стимуляции зрительного анализатора) и не думать о чем-либо конкретном. МРТ-данные обрабатывали в программе SPM12 (Великобритания) в вычислительной среде MATLAB (США). Магнитно-резонансный томограф MAGNETOM Verio (Siemens; Германия) имел напряженность магнитного поля 3,0 Тл. Функциональные сканы были получены в состоянии покоя с использованием T2*-взвешенной последовательности EPI: TR — 1500 мс, TE — 30 мс, flip angle — 70°, толщина среза — 2 мм, FOV — 190 мм, фаза FoV — 100,0%.

С помощью фМРТ покоя анализировали области мозга с активированным BOLD-сигналом и пересекающиеся с источниками генерации сверхмедленной активности мозга, которая регистрировалась неполяризуемыми электродами в нижнем лобном отведении.

Проводились дополнительные доплерографические исследования для исключения патологической асимметрии кровообращения.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica-12 (Dell; США). Оценивали нормальность распределения по критерию Колмогорова–Смирнова. Вычисляли средние арифметические, стандартные отклонения, стандартные ошибки и дисперсию, проводили однофакторный дисперсионный и корреляционный анализы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Среднее количество слов, которые воспроизводили 50 больных ХИМ после пяти повторений 10 слов, составляет 7,6 слова (стандартная ошибка $\pm 0,2$ слова). Испытуемые были объединены в две группы: 1-я группа (25 человек) воспроизводила после пяти повторений семь и менее слов, испытуемые 2-й группы (25 человек) воспроизводили соответственно восемь и более слов. Среднее значение запомненных слов в первой группе — $6,4 \pm 0,2$ слова; а во второй — $8,9 \pm 0,2$ слова. Группы не различались по возрасту (уровень значимости возрастных различий $p = 0,91$). Средний возраст в 1-й группе — $66,7 \pm 2,0$ года; во 2-й группе — $64,4 \pm 1,8$ года.

На рис. 1 показаны области мозга, в которых значения BOLD-сигналов выше во второй группе испытуемых.

При исследовании разности BOLD-сигналов выделяются области с высоким T-критерием. Далее в круглых скобках приводятся координаты мозга по системе MNI (Monreal Neurological Institute), анатомическое название и в некоторых случаях сетевое название. Наиболее активированная область с MNI координатами ($-27 -67 6$) соответствует левой язычной извилине — Visual network, *L. lingual gyrus*, которая в данном случае активирована как структура, в первую очередь, рабочей памяти. На рис. 1 эта область находится в перекрестье осей координат. Среди других следует отметить левую постцентральную извилину — Somatomotor network, *L. postcentral gyrus* ($-28 -26 60$), левую поясную извилину — Default mode

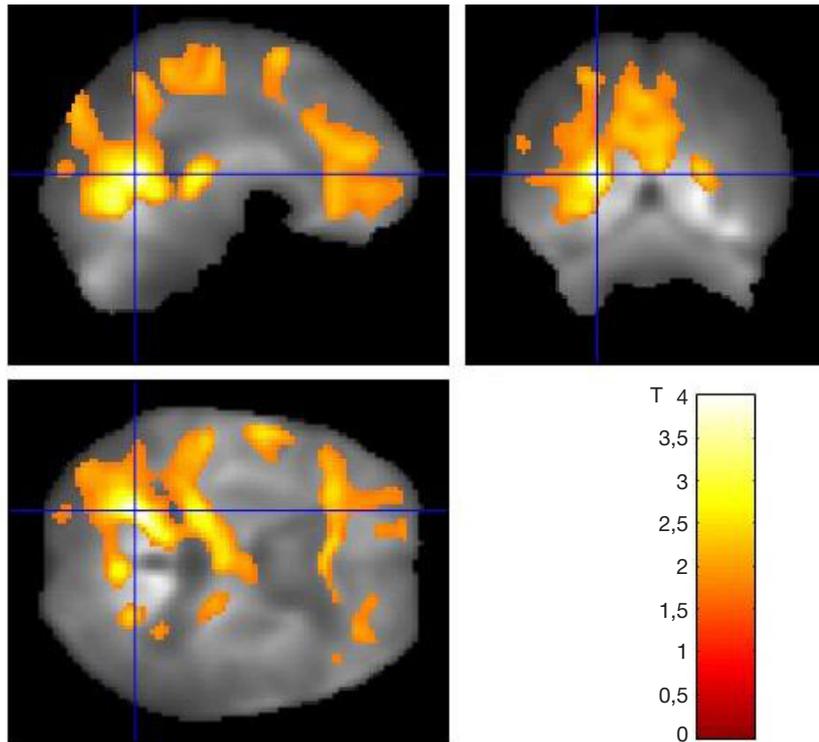


Рис. 1. Области мозга, соответствующие разности активированных вокселей у больных с высокими и низкими показателями рабочей памяти по данным фМРТ. Справа внизу – шкала Т-критерия. Разность активированных вокселей при уровне значимости менее 0,05 соответствует значению Т больше 1,68

network, *L. cingulate gyrus* (-28 -51 38), а также левую нижнюю лобную извилину — Language network, *L. inferior frontal gyrus* (-28 25 8).

В группе больных с хорошей рабочей памятью активация BOLD-сигнала фМРТ существенно выше, чем у пациентов с плохой, что связано с более высокой нейронной активностью в областях, показанных на рис. 1. Это ассоциировано также с более высоким энергетическим обменом в указанных областях и прилегающих к ним регионах, что дает основание предполагать изменение рН и соответственно различия по УПП. Однако у больных с

ХИМ часто нарушено церебральное кровообращение. В силу этого активированы нейродегенеративные процессы, приводящие к более высоким УПП у лиц с плохой памятью. У лиц с высокой ВРП ацидоз не выражен, поэтому УПП более низкий. Методом ANOVA найдены достоверные различия для УПП в лобном отведении для лиц с высокими и низкими значениями ВРП в лобном отведении в состоянии покоя и при выполнении когнитивного тестирования (рис. 2А, Б).

Интересно, что различия между двумя группами более значимы в состоянии покоя, а не при выполнении

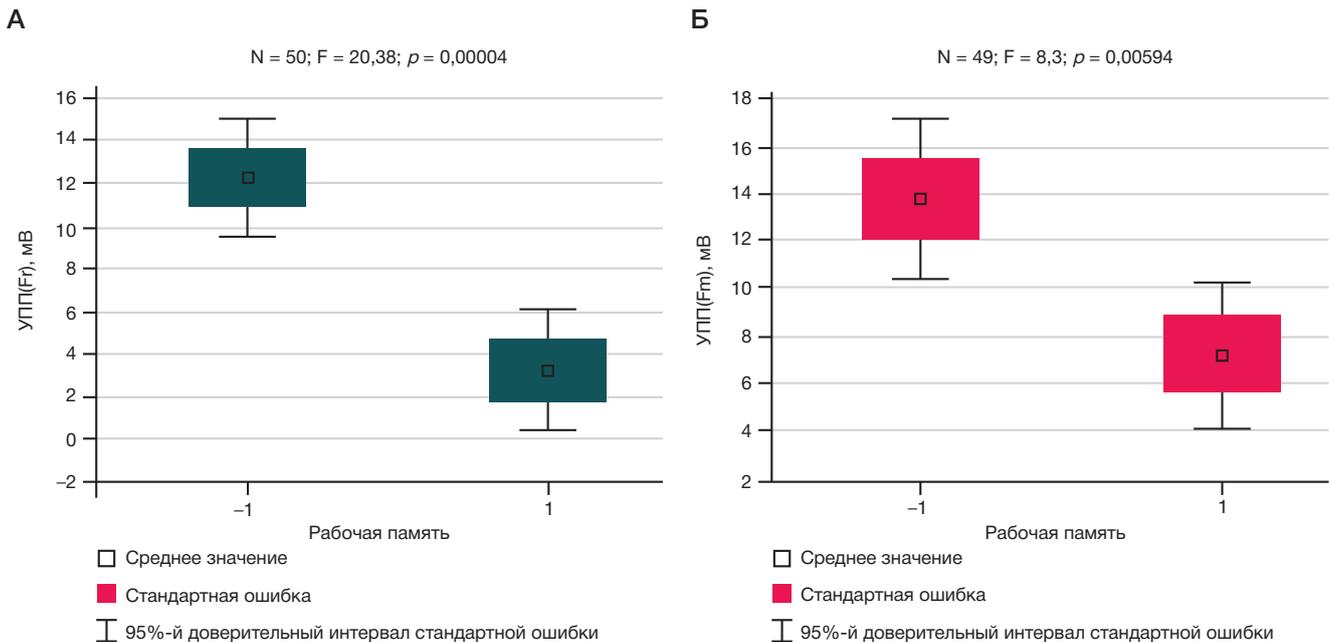


Рис. 2. УПП в лобном отведении в двух группах больных ХИМ с низкими (-1) и высокими (1) значениями ВРП в состоянии покоя (А) и при выполнении теста Лурья (Б). Статистические характеристики различий показаны вверху рисунка. По оси ординат даны значения УПП в мВ. F — критерий Фишера; N — число испытуемых; p — уровень значимости

Таблица. Уровень значимости различий в двух группах ВРП больных с ХИМ при разных отведениях УПП

Отведения УПП	Уровень значимости различий УПП в двух группах (<i>p</i>)
F (Лобное)	0,000041
C (Центральное)	0,015256
O (Затылочное)	0,007895
Td (Правое височное)	0,010093
Ts (Левое височное)	0,085361

когнитивной задачи (рис. 2А, Б). Это поддерживает представления о том, что нейросети в покое и при выполнении когнитивных тестов в значительной мере перекрываются, особенно если они выполняют близкие задания, связанные, как в данном случае, с решением вербальных задач и концентрацией внимания.

В других отведениях УПП межгрупповые различия менее выражены (см. таблицу).

Рассмотрим разность фМРТ у испытуемых, различающихся по УПП в лобном отведении. В первую группу вошли испытуемые, чьи УПП в лобном отведении были менее 6,5 мВ, во вторую — более 6,5 мВ (рис. 3).

На рис. 3 представлено распределение разности активированных вокселей, связанных с группами больных, различающихся по УПП в лобном отведении.

Использовали сравнение фМРТ в двух группах больных, различающихся по показателям ВРП, и с двумя группами с низкими и высокими показателями УПП. Это позволяет выявить области активации, одновременно обусловленные этими двумя факторами, поскольку одной из возможных причин связи УПП с когнитивными функциями является перекрытие областей, одновременно связанных с рабочей памятью и с генерацией УПП в лобном отведении. Такие области были найдены (рис. 4).

Таким образом, можно понять какие области ответственны за генерацию УПП и почему УПП, в данном случае, является маркером рабочей памяти.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей выборке у больных, включенных во 2-ю группу с более высокой ВРП, показатели практически не отличались от нормы. Это перекликается с данными других авторов о частом отсутствии объективного подтверждения снижения когнитивных функций у сосудистых больных на начальном этапе заболевания даже при наличии субъективных жалоб [23]. У больных с ХИМ, включенных в первую группу с более низкой ВРП, показатели ВРП были характерны для больных сосудистыми или нейродегенеративными заболеваниями, без признаков деменции [23]. Активированные воксели у лиц с более высокой ВРП располагались преимущественно в структурах левого полушария, тогда как области зрительно-пространственной рабочей памяти находятся, главным образом, в правом полушарии [2, 3]. Обнаружен определенный параллелизм между разностью активированных вокселей фМРТ в двух группах памяти и УПП у больных с высокой и низкой рабочей памятью. Представления о связи сверхмедленной активности

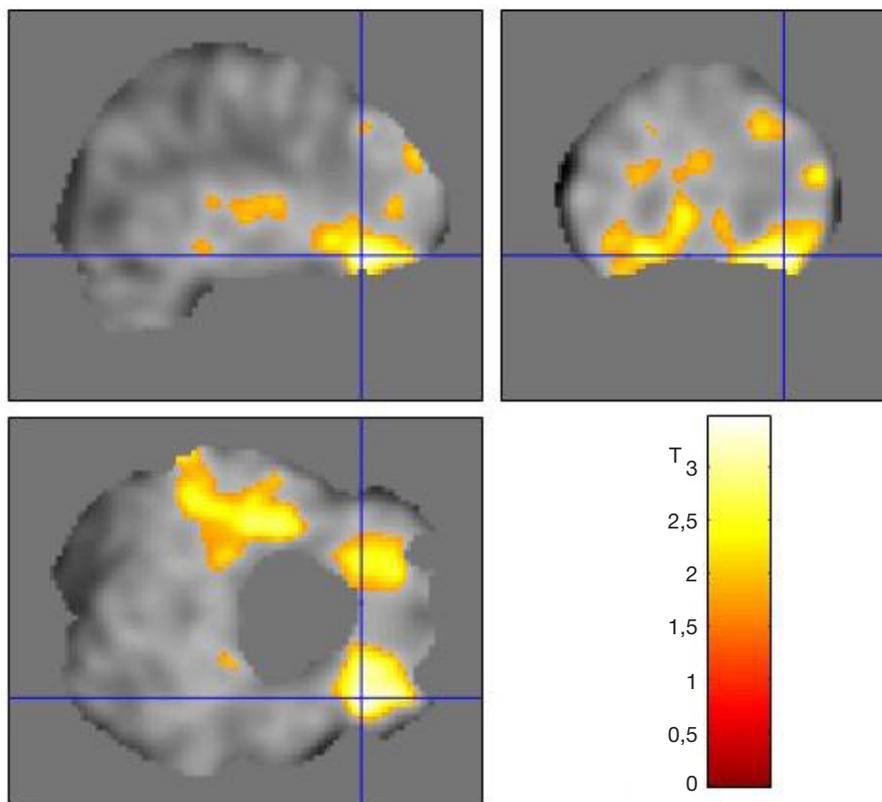


Рис. 3. Области мозга, соответствующие разности активированных вокселей у больных ХИМ с низким и высоким УПП в лобной области. На рис. 3 выделяются активированные воксели в правой и левой латеральной фронто-орбитальных извилинах (28 36 –16) и (–28 36 –16), а также в левой верхней височной извилине (–40 –17 –7). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

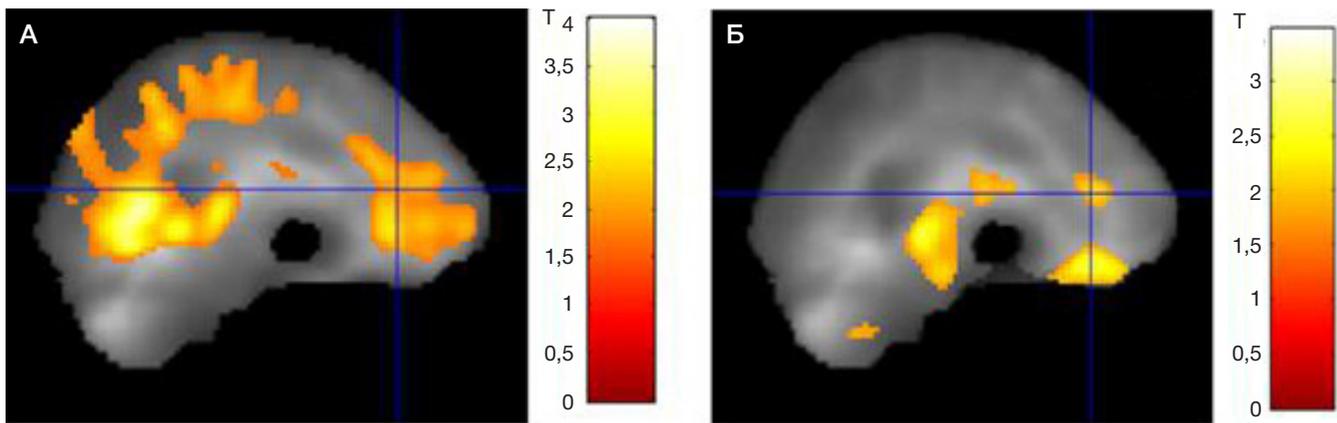


Рис. 4. Область мозга, соответствующая пересечению сети рабочей памяти с областями, генерирующими сверхмедленную активность. Область пересечения координатных осей соответствует MNI-координатам $-28\ 32\ 18$, — левой средней лобной извилине (middle frontal gyrus), сетям DMN и Saliense Network. В этих областях наблюдается разность активированных вокселей у больных с хорошей и менее хорошей рабочей памятью (**А**) и с низкими и высокими показателями УПП при лобном отведении сверхмедленных потенциалов (**Б**). Эта область показана перекрестием координатных осей на обоих рисунках, А и Б

милливольтного диапазона с нейросетями покоя давно обсуждались в литературе и были подтверждены в исследовании [24]. Авторы статьи не исключают связь этих потенциалов с потенциалами ГЭБ. В настоящей работе показан конкретный механизм подобного взаимодействия, который связан с наличием общего участка в нейросетях ВРП и УПП. По-видимому, этот участок ВРП состоит из нейронов, синергичных с процессами генерации сверхмедленной электрической активности. Остальные участки сети ВРП и УПП генерируются неперекрывающимися участками нейросетей. При активном бодрствовании, например, при выполнении заданий нейросети покоя перестают выполнять прежние задачи, а анатомически близкие области этих сетей, а скорее всего те же самые сети, обладающие мультимодальными нейронами, переключаются на решение других задач, соответствующих новым условиям [16]. При этом емкость ВРП может быть предсказана на основе нейросетей покоя [25]. Похожая закономерность наблюдалась в наших исследованиях, когда различия в сверхмедленной активности в покое и при когнитивной задаче соответствовали различиям в ВРП пациентов с ХИМ. Это можно видеть на примере того, что две группы испытуемых в состоянии спокойного бодрствования и при решении когнитивных задач демонстрируют устойчивые неменяющиеся различия по характеристикам сверхмедленной активности. Так как соотношение показателей УПП (рис. 2) в покое и при выполнении заданий в двух группах больных примерно одинаково, можно думать, что соотношение между активированными (работающими) нейронами сохраняются в обеих группах при этих двух состояниях.

Использование фМРТ покоя открывает новые возможности для выявления биомаркеров, для этого достаточно оценить перекрытие двух нейросетей покоя.

Одна нейросеть покоя — это сеть основного процесса (в данной статье нейросеть ВРП) и вторая нейросеть — это сеть самого биомаркера, т. е. такой синхронизированной группы нейронов, которая ответственна не только за генез основного процесса, но и за такой вид электрических процессов, которые могут быть зарегистрированы неинвазивно. Данный подход к использованию фМРТ покоя снимает основной вопрос о специфичности биомаркера, поскольку специфичность определяется перекрытием сети ВРП с другой нейросетью, функционирование которой может быть зарегистрировано удобным для изучения образом, например, электрофизиологически и неинвазивно, как в данном случае.

Выводы

Рабочая память — это фундаментальная функция, ответственная за временное хранение и обработку информации, необходимой для решения различных когнитивных задач. Биомаркеры рабочей памяти могут помочь понять индивидуальные различия в когнитивных способностях, а также улучшить диагностику и лечение когнитивных нарушений. Рассмотрение рабочей памяти с точки зрения функционирования нейроваскулярной единицы привело к изучению динамики сверхмедленных потенциалов в качестве возможных биомаркеров рабочей памяти. Исследования фМРТ покоя выявили области мозга и сети, участвующие в функционировании рабочей памяти. Некоторые из них перекрываются с участками мозга, генерирующими сверхмедленную активность, которая может быть зарегистрирована в лобном отведении. Эти сверхмедленные потенциалы могут быть рассмотрены как биомаркеры ВРП в силу перекрытия областей мозга, участвующих в процессах рабочей памяти и генерации сверхмедленной электрической активности.

Литература

- Miller EK, Lundqvist M, Bastos AM. Working Memory 2.0. *Neuron*. 2018; 100 (2): 463–75. Available from: <http://doi:10.1016/j.neuron.2018.09.023>.
- Goethals I, Audenaert K, Jacobs F, Van De Wiele C, Vermeir G, et al. Toward clinical application of neuropsychological activation probes with SPECT: a spatial working memory task. *J Nucl Med*. 2002; 43 (11): 1426–31. PMID: 12411543.
- Kotlyusov AI, Kasanov D, Kosachenko AI, Gashkova AS, Pavlov YG, Malykh S. Working memory capacity depends on attention control, but not selective attention. *Behav Sci (Basel)*. 2023; 13 (2): 92. Available from: <http://doi:10.3390/bs13020092>. PMID: 36829321; PMCID: PMC9952259.
- Klaus K, Pennington K. Dopamine and working memory: genetic variation, stress and implications for mental health. *Curr Top Behav Neurosci*. 2019; 41: 369–91. Available from: http://doi:10.1007/7854_2019_113. PMID: 31502081.
- Olesen PJ, Westerberg H, Klingberg T. Increased prefrontal and parietal activity after training of working memory. *Nat Neurosci*. 2004; 7: 75–79. Available from: <http://doi:10.1038/nn1165>.
- Owen AM, McMillan KM, Laird AR, Bullmore E. N-back working memory paradigm: a meta-analysis of normative functional neuroimaging studies. *Hum Brain Mapp*. 2005; 25 (1): 46–59. Available from: <http://doi:10.1002/hbm.20131>. PMID: 15846822; PMCID: PMC6871745.
- Muoio V, Persson PB, Sendeski MM. Neurovascular unit — an overview of the concept. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014; 210 (4): 790–8. Available from: <http://doi:10.1111/apha.12250>. PMID: 24629161.
- Schaeffer S, Iadecola C. Revisiting the neurovascular unit. *Nat Neurosci*. 2021; 24: 1198–209. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00904-7>.
- Ho C, Russu IM. How much do we know about the Bohr effect of hemoglobin? *Biochemistry*. 1987; 26 (20): 6299–305. Available from: <http://doi:10.1021/bi00394a001>. PMID: 3322377.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7 (1): 41–53. Available from: <http://doi:10.1038/nrn1824>. PMID: 16371949.
- Фокин В. Ф., Пономарева Н. В. Энергетическая физиология мозга. М.: Антидор, 2003; 288 с.
- Drew PJ, Mateo C, Turner KL, Yu Xin, Kleinfeld D. Ultra-slow oscillations in fMRI and resting-state connectivity: neuronal and vascular contributions and technical confounds. *Neuron*. 2020; 107 (5): 782–804. ISSN 0896-6273. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.07.020>.
- Nita DA, Vanhatalo S, Lafortune F-D, Voipio J, Kaila K, Amzica F. Nonneuronal origin of CO₂-related DC EEG shifts: an in vivo study in the cat. *Journal of Neurophysiology*. 2004; 92: 1011–22. Available from: <https://doi:10.1152/jn.00110.2004>. Epub 2004 Mar 31. PMID: 15056689.
- Voipio J, Tallgren P, Heinonen E, Vanhatalo S, Kaila K: Millivolt-scale DC shifts in the human scalp EEG: evidence for a nonneuronal generator. *Journal of neurophysiology*. 2003, 89: 2208–14. Available from: <https://doi:10.1152/jn.00915.2002>. Epub 2002 Dec 11. PMID: 12612037.
- Пономарева Н. В., Селезнева Н. Д., Кольхалов И. В. Нейрофизиологические механизмы деятельности мозга при болезни Альцгеймера. *Вопросы геронтопсихиатрии*. 1991: 107–12.
- Ito T, Kulkarni KR, Schultz DH, et al. Cognitive task information is transferred between brain regions via resting-state network topology. *Nat Commun*. 2017; 8 (1): 1027. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01000-w>.
- Biswal BB, Mennes M, Zuo XN, Gohel S, Kelly C, Smith SM, et al. Toward discovery science of human brain function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107 (10): 4734–9. Available from: <https://doi:10.1073/pnas.0911855107>. Epub 2010 Feb 22. PMID: 20176931; PMCID: PMC2842060.
- Jian Li, Yijun Liu, Jessica L. Wisnowski, Richard M. Leahy. Identification of overlapping and interacting networks reveals intrinsic spatiotemporal organization of the human brain. *NeuroImage*. 2023; 270. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2023.119944>.
- Танашян М. М., Максимова М. Ю., Домашенко М. А. Дисциркуляторная энцефалопатия. *Путеводитель врачей назначений*. 2015; 2: 1–25.
- Батышева Т. Т., Артемова И. Ю., Вдовиченко Т. В. Хроническая ишемия мозга: механизмы развития и современное комплексное лечение. *Consilium medicum*. 2004; 3 (4).
- Захаров В. В., Локшина А. Б. Когнитивные нарушения при дисциркуляторной энцефалопатии. *PMЖ*. 2009; 20: 1325–31.
- Morris JC. Clinical dementia rating: a reliable and valid diagnostic and staging measure for dementia of the Alzheimer type. *Int Psychogeriatric*. 1997; (9 Suppl 1): 173–6.
- Blom K, Koek HL, Zwartbol MHT, van der Graaf Y, Kesseler L, Biessels GJ, et al. SMART Study Group. Subjective cognitive decline, brain imaging biomarkers, and cognitive functioning in patients with a history of vascular disease: the SMART-Medea study. *Neurobiol Aging*. 2019; 84: 33–40. Available from: <https://doi:10.1016/j.neurobiolaging.2019.07.011>. Epub 2019 Jul 24. PMID: 31479862.
- Hiltunen T, Kantola J, Abou Elseoud A, Lepola P, Suominen K, Starck T, et al. Infra-slow EEG fluctuations are correlated with resting-state network dynamics in fMRI. *J Neurosci*. 2014; 34 (2): 356–62. Available from: <https://doi:10.1523/JNEUROSCI.0276-13.2014>. PMID: 24403137; PMCID: PMC6608153.
- Osaka M, Kaneeda M, Azuma M, et al. Capacity differences in working memory based on resting state brain networks. *Sci Rep*. 2021; 11 (19502). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98848-2>.

References

- Miller EK, Lundqvist M, Bastos AM. Working Memory 2.0. *Neuron*. 2018; 100 (2): 463–75. Available from: <http://doi:10.1016/j.neuron.2018.09.023>.
- Goethals I, Audenaert K, Jacobs F, Van De Wiele C, Vermeir G, et al. Toward clinical application of neuropsychological activation probes with SPECT: a spatial working memory task. *J Nucl Med*. 2002; 43 (11): 1426–31. PMID: 12411543.
- Kotlyusov AI, Kasanov D, Kosachenko AI, Gashkova AS, Pavlov YG, Malykh S. Working memory capacity depends on attention control, but not selective attention. *Behav Sci (Basel)*. 2023; 13 (2): 92. Available from: <http://doi:10.3390/bs13020092>. PMID: 36829321; PMCID: PMC9952259.
- Klaus K, Pennington K. Dopamine and working memory: genetic variation, stress and implications for mental health. *Curr Top Behav Neurosci*. 2019; 41: 369–91. Available from: http://doi:10.1007/7854_2019_113. PMID: 31502081.
- Olesen PJ, Westerberg H, Klingberg T. Increased prefrontal and parietal activity after training of working memory. *Nat Neurosci*. 2004; 7: 75–79. Available from: <http://doi:10.1038/nn1165>.
- Owen AM, McMillan KM, Laird AR, Bullmore E. N-back working memory paradigm: a meta-analysis of normative functional neuroimaging studies. *Hum Brain Mapp*. 2005; 25 (1): 46–59. Available from: <http://doi:10.1002/hbm.20131>. PMID: 15846822; PMCID: PMC6871745.
- Muoio V, Persson PB, Sendeski MM. Neurovascular unit — an overview of the concept. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014; 210 (4): 790–8. Available from: <http://doi:10.1111/apha.12250>. PMID: 24629161.
- Schaeffer S, Iadecola C. Revisiting the neurovascular unit. *Nat Neurosci*. 2021; 24: 1198–209. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00904-7>.
- Ho C, Russu IM. How much do we know about the Bohr effect of hemoglobin? *Biochemistry*. 1987; 26 (20): 6299–305. Available from: <http://doi:10.1021/bi00394a001>. PMID: 3322377.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7 (1): 41–53. Available from: <http://doi:10.1038/nrn1824>. PMID: 16371949.
- Fokin VF, Ponomareva NV. Энергетическая физиология мозга.

- M.: Antidor, 2003; 288 s. Russian.
12. Drew PJ, Mateo C, Turner KL, Yu Xin, Kleinfeld D. Ultra-slow oscillations in fMRI and resting-state connectivity: neuronal and vascular contributions and technical confounds. *Neuron*. 2020; 107 (5): 782–804. ISSN 0896-6273. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.07.020>.
 13. Nita DA, Vanhatalo S, Lafortune F-D, Voipio J, Kaila K, Amzica F: Nonneuronal origin of CO₂-related DC EEG shifts: an in vivo study in the cat. *Journal of Neurophysiology*. 2004; 92: 1011–22. Available from: <https://doi:10.1152/jn.00110.2004>. Epub 2004 Mar 31. PMID: 15056689.
 14. Voipio J, Tallgren P, Heinonen E, Vanhatalo S, Kaila K: Millivolt-scale DC shifts in the human scalp EEG: evidence for a nonneuronal generator. *Journal of neurophysiology*. 2003, 89: 2208–14. Available from: <https://doi:10.1152/jn.00915.2002>. Epub 2002 Dec 11. PMID: 12612037.
 15. Ponomareva NV, Selezneva ND, Kolyhalov IV. Nejrofiziologicheskie mehanizmy dejatel'nosti mozga pri bolezni Al'cgejmara. *Voprosy gerontopsihiatrii*. 1991: 107–12. Russian.
 16. Ito T, Kulkarni KR, Schultz DH, et al. Cognitive task information is transferred between brain regions via resting-state network topology. *Nat Commun*. 2017; 8 (1): 1027. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01000-w>.
 17. Biswal BB, Mennes M, Zuo XN, Gohel S, Kelly C, Smith SM, et al. Toward discovery science of human brain function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107 (10): 4734–9. Available from: <https://doi:10.1073/pnas.0911855107>. Epub 2010 Feb 22. PMID: 20176931; PMCID: PMC2842060.
 18. Jian Li, Yijun Liu, Jessica L. Wisnowski, Richard M. Leahy. Identification of overlapping and interacting networks reveals intrinsic spatiotemporal organization of the human brain. *NeuroImage*. 2023; 270. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2023.119944>.
 19. Tanashjan MM, Maksimova MYu, Domashenko MA. Discirkuljatornaja jencefalopatija. *Putevoditel' vrachebnyh naznachenij*. 2015; 2: 1–25. Russian.
 20. Batysheva TT, Artemova IYu, Vdovichenko TV. Hronicheskaja ishemija mozga: mehanizmy razvitiya i sovremennoe kompleksnoe lechenie. *Consilium medicum*. 2004; 3 (4). Russian.
 21. Zaharov VV, Lokshina AB. Kognitivnye narusheniya pri discirkuljatornoj jencefalopatii. *RMZh*. 2009; 20: 1325–31. Russian.
 22. Morris JC. Clinical dementia rating: a reliable and valid diagnostic and staging measure for dementia of the Alzheimer type. *Int Psychogeriatric*. 1997; (9 Suppl 1): 173–6.
 23. Blom K, Koek HL, Zwartbol MHT, van der Graaf Y, Kesseler L, Biessels GJ, et al. SMART Study Group. Subjective cognitive decline, brain imaging biomarkers, and cognitive functioning in patients with a history of vascular disease: the SMART-Medea study. *Neurobiol Aging*. 2019; 84: 33–40. Available from: <https://doi:10.1016/j.neurobiolaging.2019.07.011>. Epub 2019 Jul 24. PMID: 31479862.
 24. Hiltunen T, Kantola J, Abou Elseoud A, Lepola P, Suominen K, Starck T, et al. Infra-slow EEG fluctuations are correlated with resting-state network dynamics in fMRI. *J Neurosci*. 2014; 34 (2): 356–62. Available from: <https://doi:10.1523/JNEUROSCI.0276-13.2014>. PMID: 24403137; PMCID: PMC6608153.
 25. Osaka M, Kaneda M, Azuma M, et al. Capacity differences in working memory based on resting state brain networks. *Sci Rep*. 2021; 11 (19502). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98848-2>.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ ПРИ УМЕРЕННО НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

А. А. Власов¹ ✉, С. Ф. Андрусенко¹, Е. В. Денисова¹, А. Б. Эльканова¹, А. А. Каданова¹, Е. А. Мельченко¹, Н. Н. Сокульская¹, Д. А. Доменюк²

¹ Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

² Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия

Криопротекторы позволяют долгосрочно хранить биоматериалы. Несмотря на имеющиеся успехи в криоконсервации, существует ряд проблем, связанных с разрушением клеточных оболочек, из-за недостаточной эффективности и токсичности некоторых компонентов. В связи с этим, важное значение имеет разработка нетоксичных криоконсервантов, эффективно работающих при низких температурах. Целью работы было оценить морфофункциональные особенности форменных элементов крови в криоконсерванте с лактулозой с учетом воздействия умеренно низкой температуры (–40 °С). Были исследованы форменные элементы крови (лейкоциты, эритроциты, тромбоциты), полученные от 30 условно здоровых добровольцев-доноров женского пола в возрасте 18–23 лет. Общий анализ крови выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе «Гемалит 1270». Компьютерное цитоморфометрическое исследование проводили на аппаратно-программном комплексе «МЕКОС-Ц2». По результатам исследования установлена морфологическая и функциональная сохранность форменных элементов крови после одних суток хранения при температуре –40 °С при добавлении разработанного криоконсерванта с лактулозой: для эритроцитов — $85,3 \pm 0,30\%$ ($p < 0,05$), для тромбоцитов — $75 \pm 0,71\%$ ($p < 0,05$), для лейкоцитов — $90,1 \pm 0,91\%$ ($p < 0,05$) от значений, зарегистрированных до замораживания. Результаты демонстрируют потенциал использования лактулозы в качестве нетоксичного компонента для криоконсервирующих систем, что расширит спектр применяемых криоконсервантов и позволит проводить анализ морфофункциональных параметров образцов замороженной цельной крови при крупномасштабных исследованиях.

Ключевые слова: криоконсервирование, эритроциты, лейкоциты, тромбоциты, лактулоза, умеренно низкая температура

Вклад авторов: А. А. Власов — концепция исследования, проведение и интерпретация результатов; С. Ф. Андрусенко — дизайн исследования, анализ литературы, написание статьи; Е. В. Денисова, А. А. Каданова, Н. Н. Сокульская — сбор информации; А. Б. Эльканова, Е. А. Мельченко — обработка данных; Д. А. Доменюк — редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Северо-Кавказского федерального университета (протокол № 002 от 11 июля 2024 г.); все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Александр Александрович Власов
ул. Пушкина, д. 1, г. Ставрополь, 355017, Россия; avlasov@ncfu.ru

Статья получена: 17.07.2024 **Статья принята к печати:** 25.08.2024 **Опубликована онлайн:** 17.09.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.038

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF CRYOPRESERVED BLOOD CELLS AT MODERATE LOW TEMPERATURE

Vlasov AA¹ ✉, Andrusenko SF¹, Denisova EV¹, Elkanova AB¹, Kadanova AA¹, Melchenko EA¹, Sokulskaya NN¹, Domenyuk DA²

¹ North Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

² Stavropol State Medical University, Stavropol, Russia

Cryoprotectants enable the long-term storage of biomaterials. Despite progress in cryopreservation, there are a number of problems associated with damage to the cell membranes that result from insufficient efficacy and toxicity of some components. In this regard, it is important to develop non-toxic cryopreservation agents performing well at low temperature. The study was aimed to assess morphofunctional features of blood cells in the lactulose-based cryopreservation agent considering the effects of moderate low temperature (–40 °C). Blood cells (leukocytes, erythrocytes, platelets) collected from 30 conditionally healthy female voluntary donors aged 18–23 years were assessed. The complete blood count test was performed using the Gemalight 1270 automated hematology analyzer. Computerized cytomorphometric assessment was performed using the MECOS-C2 hardware and software complex. The study results showed morphological and functional integrity of blood cells after the 24 h storage at the temperature of –40 °C when added the lactulose-based cryopreservation agent developed: erythrocytes — $85.3 \pm 0.30\%$ ($p < 0.05$), platelets — $75 \pm 0.71\%$ ($p < 0.05$), leukocytes — $90.1 \pm 0.91\%$ ($p < 0.05$) of the values reported before freezing. The findings demonstrate the potential of using lactulose as a non-toxic component of cryopreservation systems, which will expand the range of cryopreservation agents used and make it possible to analyze morphofunctional parameters of frozen whole blood samples when conducting large-scale studies.

Keywords: cryopreservation, erythrocytes, leukocytes, platelets, lactulose, moderate low temperature

Author contribution: Vlasov AA — study concept, procedure, interpretation of the results; Andrusenko SF — study design, literature review, manuscript writing; Denisova EV, Kadanova AA, Sokulskaya NN — data acquisition; Elkanova AB, Melchenko EA — data processing; Domenyuk DA — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the North Caucasus Federal University (protocol No. 002 dated 11 July 2024); all subjects submitted the informed consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander A. Vlasov
Pushkina, 1, Stavropol, 355017, Russia; avlasov@ncfu.ru

Received: 17.07.2024 **Accepted:** 25.08.2024 **Published online:** 17.09.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.038

Одним из приоритетных и перспективных направлений в современной биологии, а также экспериментальной и клинической медицине является оптимизация методов криоконсервации биоматериалов с возможностью пролонгированного сохранения их функциональных и фенотипических особенностей. При этом способы криоконсервации биоматериала должны обладать низкой

токсичностью и поддерживать клеточные механизмы гомеостаза. Существенное замедление метаболизма в клетке начинается при температуре –70 °С, поэтому применяют консервирование с использованием жидкого азота, но это требует громоздкого дорогостоящего оборудования, регулярного пополнения запасов жидкого азота, что сказывается на себестоимости

хранения материала. Кроме того, такой тип консервации способствует изменению тромбогенности [1], в связи с чем востребованы эффективные криоконсерванты с максимальным сохранением биологических свойств консервируемых биообъектов.

Наилучшие результаты достигаются при использовании комбинированных криоконсервантов, содержащих как проникающие, так и непроникающие криопротекторы. Однако, несмотря на имеющиеся успехи в криоконсервации, существует ряд проблем, связанных с разрушением клеточных оболочек, из-за недостаточной эффективности [2] и токсичности ряда компонентов [3–5]. Целесообразным является внесение липидов, белков и углеводов в качестве компонентов природного происхождения [6–10], а также многоатомных спиртов [11] для уменьшения токсического действия компонентов, входящих в состав криоконсерванта, в том числе при замораживании венозной крови человека [12]. Выраженным защитным действием на клеточные мембраны обладает трегалоза [13–16], для которой подтвержден синергический эффект в комбинации с диметилсульфоксидом (ДМСО) [17].

Одним из направлений совершенствования криоконсервации является поиск новых нетоксичных компонентов, таких как лактулоза. В ходе исследований лактулозы данных о токсическом, тератогенном или мутагенном действии в опытах на животных и в клинических исследованиях с участием людей получено не было [18]. При этом отмечены защитные свойства лактулозы, повышающей выживаемость кислотолюбивых культур при заморозке. Внесение до 3% лактулозы в смесь с кислотолюбивыми микроорганизмами способствовало увеличению числа жизнеспособных клеток культуры при замораживании продукции до температуры $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ [19]. Есть данные, что лактулоза в сочетании с лецитином оказывает криопротекторное действие на пробиотики при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [20]. Таким образом, использование лактулозы может найти применение в практической деятельности для сохранения биологических объектов при замораживании в качестве нетоксичного компонента криоконсервантов.

Образцы свежей цельной крови наиболее предпочтительны для анализа, однако к недостаткам работы со свежей кровью относятся необходимость ее быстрого анализа после взятия биопробы и ограниченное число повторных анализов, которые могут быть выполнены без дополнительного взятия крови [21]. Описан опыт криоконсервирования в полевых условиях капиллярной крови с последующим анализом методом цитометрии, связанной с необходимостью немедленного анализа образцов [22], однако аналогичных данных о криоконсервировании венозной крови нет. Кроме того, актуальна сохранность гемопоэтических стволовых клеток периферической крови как процедура лечения гематологических, онкологических и аутоиммунных заболеваний [23].

Цель работы — оценить морфофункциональные особенности форменных элементов крови в криоконсерванте с лактулозой с учетом воздействия умеренно низкой температуры ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Критерии включения пациентов в исследование: условно здоровые доноры в возрасте 18–23 лет женского пола в

первой фазе менструального цикла, в количестве 30 человек, отсутствие хронических заболеваний в период обострения. Объект исследования — периферическая венозная кровь, стабилизированная КЗ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) *in vitro*.

Из числа проб периферической венозной крови, полученных от добровольцев доноров, были сформированы три группы. В контрольную группу вошли 10 образцов крови, в которой исследовали характеристики и параметры форменных элементов крови при температуре $+20 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. В 1-ю опытную группу вошли 10 образцов крови, в которые был внесен криоконсервант. Данные образцы исследовали по истечении 4 ч, при температуре $+20 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Во 2-ю опытную группу вошли 10 образцов крови, в которые был внесен криоконсервант, при этом образцы были введены в состояние холодового анабиоза при температуре $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 24 ч. Далее образцы размораживали и исследовали характеристики и параметры форменных элементов крови при температуре $+20 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

При приготовлении модельного криоконсерванта были использованы растворы солей, поддерживающие изотоническую концентрацию. В качестве проникающих в клетку криокомпонентов использовали глицерин и ДМСО, в качестве не проникающего дисахарид лактулозу. Конечный состав модельного криоконсерванта имел следующие соотношения компонентов, об. %: глицерин (чда, Россия) — 20, ДМСО (хч, Россия) — 10, лактулоза (торговая марка «Лактусан» по ТУ 9229-004-53757476-04; Россия) — 2,5, хлорид натрия (чда, Россия) — 0,25, натрий фосфорнокислый двузамещенный (чда, Россия) — 0,25, вода для инъекций (Дальхимфарм; Россия) — до 100%.

Раствор криоконсерванта автоклавируют (без ДМСО) при 1,2 атм в течение 30 мин. Готовый раствор хранили в холодильнике при $+2$ — $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Стерилизацию ДМСО осуществляли с использованием установки стерилизующей фильтрации и хранили в стерильных пробирках при температуре $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Раствор ДМСО вносили в готовый стерильный криоконсервант непосредственно перед замораживанием образцов крови.

В образцы 1-й и 2-й опытных групп добавляли с помощью дозатора криоконсервант в соотношении кровь : криоконсервант как 2 : 1 по объему. Пробирки герметизировали пробками, содержимое перемешивали в течение 10 мин. Далее образцы 1-й опытной группы спустя 4 ч исследовали при температуре $+20 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Образцы 2-й опытной группы помещали в морозильную камеру электроморозильника с температурой $-20 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ в хладагент в виде раствора 38–45 об.% этилового спирта 96 об.% с температурой холодовой адаптации -26 – $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, объем замораживаемого образца составил 10% от объема хладагента, выдерживали в нем 30 мин и перемещали для окончательного замораживания и хранения в камеру электроморозильника с температурой $-40 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 24 ч. После этого образцы размораживали в водяной бане UT-4334 (ULAB; Россия) при покачивании (2–3 раза/с) в ручном режиме при температуре $+40 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 мин. Далее исследовали характеристики и параметры форменных элементов крови при температуре $+20 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Компьютерное цитоморфометрическое исследование клеток крови выполняли на аппаратно-программном комплексе «МЕКОС-Ц2» («Медицинские компьютерные системы»; Россия). Для проведения *in vitro* диагностических тестов образцов крови в лабораторных условиях использовали автоматический гематологический анализатор «Гемалайт 1270» (Dixon; Россия). Для

Таблица 1. Лейкоцитарные показатели ОАК в группах исследований ($X \pm m$; p)

Показатели ОАК	Контрольная группа ($n = 10$)	1-я опытная группа $+20 \pm 1,0$ °C ($n = 10$)	2-я опытная группа $-40 \pm 1,0$ °C ($n = 10$)	Достоверность различия, p
WBC, $\times 10^9/\text{л}$	$5,60 \pm 0,92$	$4,55 \pm 0,74^*$	$4,14 \pm 0,85^{**}$	$p < 0,01$
Lym, %	$38,31 \pm 1,35$	$25,70 \pm 1,87^*$	$11,9 \pm 1,10^{**}$	$p < 0,01$
Gran, %	$56,20 \pm 3,67$	$51,10 \pm 2,05^*$	$45,3 \pm 2,71^{**}$	$p < 0,01$
Mid, %	$6,20 \pm 0,32$	$10,20 \pm 1,21$	$10,32 \pm 1,27$	$p \geq 0,2$
Сохранность, %	100	$81 \pm 0,89^*$	$90,1 \pm 0,91^{**}$	$p < 0,01$

Примечание: * — статистически достоверное различие между контрольной и 1-й опытной группой ($p < 0,01$); ** — статистически достоверное различие между контрольной и 2-й опытной группой ($p < 0,01$)

определения величины параметров RBC подсчитывали число клеток в суспензии клеток крови с разведением образца в соотношении 1 : 40 000. На гематологическом анализаторе определяли 21 лабораторный показатель, отражающий состояние лейкоцитарного, эритроцитарного и тромбоцитарного звена.

Для обработки полученных результатов использовали статистический пакет версии «IBM SPSS Statistic 23.0» (IBM Corp., Armonk, NY; USA). Характер распределения величин изучаемых показателей оценивали с помощью W -критерия Шапиро–Уилка. Уровень статистической значимости межгрупповых различий при соответствии распределения значений показателя закону нормального распределения оценивали с помощью параметрического t -критерия Стьюдента для несвязанных выборок, для показателей с ненормальным распределением — при помощи непараметрического U -критерия Манна–Уитни. Для показателей с нормальным распределением вычисляли среднее значение (X), ошибку среднего (m) и стандартное отклонение (δ). Межгрупповые различия считали достоверными (статистически значимыми) при вероятности ошибки ($p \leq 0,05$ (5% вероятности)).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ лейкоцитарных показателей крови проводили в контрольной группе до внесения криоконсерванта. В 1-й опытной группе по истечении 4 ч с момента внесения криоконсерванта при температуре $+20 \pm 1,0$ °C. Во 2-й опытной группе после размораживания образцов крови с криоконсервантом после 24-часовой инкубации при температуре $-40 \pm 1,0$ °C (табл. 1).

При анализе лейкоцитарных данных, как в 1-й, так и во 2-й опытных группах, наблюдается тенденция к снижению показателей, однако количественное и процентное соотношение осталось в пределах референсного диапазона.

Проводили анализ компьютерной цитоморфометрии лейкоцитов в контрольной группе до внесения криоконсерванта, после его внесения и 4-часовой инкубации в 1-й опытной группе при температуре $+20 \pm 1,0$ °C и во 2-й опытной группе после размораживания образцов крови с криоконсервантом при 24-часовой инкубации при температуре $-40 \pm 1,0$ °C (табл. 2).

Полученные данные имеют тенденцию к снижению показателей, однако значения укладываются в пределы референсного диапазона изменений. При этом в 1-й и во 2-й опытных группах с внесенным криоконсервантом показатели демонстрируют стабильные значения: число ядер всего — 1, число сегментов ядра всего — 1, число включений/дырок в ядре — 0 и число хвостов ядра — 2.

Анализ эритроцитарных показателей проводили в контрольной группе до внесения криоконсерванта, после его внесения и 4-часовой инкубации в 1-й опытной группе при температуре $+20 \pm 1,0$ °C и во 2-й опытной группе после размораживания образцов крови с криоконсервантом при 24-часовой инкубации при температуре $-40 \pm 1,0$ °C (табл. 3).

При сравнительном анализе показателей общего анализа крови в контрольной группе, в 1-й и 2-й опытных группах при воздействии умеренно низкой температуры наблюдается тенденция к снижению показателей, однако количественное и процентное соотношение осталось в пределах референсных значений характеристик форменных элементов.

Таблица 2. Показатели различий компьютерной цитоморфометрии в группах исследований ($X \pm m$; p)

Свойства объекта	Контрольная группа ($n = 10$)	1-я опытная группа $+20 \pm 1,0$ °C ($n = 10$)	2-я опытная группа $-40 \pm 1,0$ °C ($n = 10$)	Достоверность различия, p
Площадь клетки, мкм^2	$70 \pm 4,19$	$59 \pm 4,75$	$70 \pm 3,98$	$p \geq 0,1$
Формфактор клетки	$14,11 \pm 1,62$	$18,01 \pm 1,23$	$17,2 \pm 1,45$	$p \geq 0,1$
Индекс поляризации клетки	$0,16 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$p \geq 0,1$
Оптическая плотность цитоплазмы	$0,66 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,01$	$p \geq 0,1$
Площадь ядра, мкм^2	$52 \pm 3,85$	$40 \pm 3,21^*$	$32 \pm 2,24^{**}$	$p < 0,01$
Формфактор ядра	$14,3 \pm 2,1$	$13,1 \pm 2,88$	$13,9 \pm 2,88$	$p \geq 0,05$
Поляризация ядра	$0,06 \pm 0,001$	$0,02 \pm 0,001^*$	$0,16 \pm 0,01^{**}$	$p < 0,01$
Ядерно-клеточное отношение	$0,74 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,01$	$p \geq 0,1$
Доля дополнения ядра	$0,04 \pm 0,001$	$0,02 \pm 0,001$	$0,04 \pm 0,001$	$p \geq 0,1$

Примечание: * — статистически достоверное различие между контрольной и 1-й опытной группой ($p < 0,01$); ** — статистически достоверное различие между контрольной и 2-й опытной группой ($p < 0,01$)

Таблица 3. Эритроцитарные показатели ОАК в группах исследований ($\bar{X} \pm m$; p)

Показатели ОАК	Контрольная группа ($n = 10$)	1-я опытная группа $+20 \pm 1,0$ °C ($n = 10$)	2-я опытная группа $-40 \pm 1,0$ °C ($n = 10$)	Достоверность различия, p
RBC, $\times 10^{12}/л$	4,62 \pm 0,23	4,08 \pm 0,21	3,5 \pm 0,55	$p \geq 0,05$
HGB, г/л	131 \pm 5,27	119,25 \pm 5,48*	101,3 \pm 4,73**	$p \geq 0,1$
MCV, фл	86,3 \pm 4,32	84,3 \pm 4,14	80,6 \pm 3,38	$p \geq 0,1$
HCT, %	39,3 \pm 1,58	35,4 \pm 1,49	30,4 \pm 1,63	$p \geq 0,2$
MCH, пг	28,5 \pm 1,37	26,2 \pm 1,45	21,1 \pm 1,52	$p \geq 0,05$
MCHC, г/л	336 \pm 29,72	311 \pm 23,46	266 \pm 14,42	$p \geq 0,5$
RDW, %	12,2 \pm 1,67	11,7 \pm 1,48	10,3 \pm 1,25	$p \geq 0,5$
Сохранность, %	100	89 \pm 0,20*	85,3 \pm 0,30**	$p < 0,01$

Примечание: * — статистически достоверное различие между контрольной и 1-й опытной группой ($p < 0,01$); ** — статистически достоверное различие между контрольной и 2-й опытной группой ($p < 0,01$)

Проводили анализ компьютерной цитоморфометрии эритроцитов в контрольной группе до внесения криоконсерванта, после его внесения и 4-часовой инкубации в 1-й опытной группе при температуре $+20 \pm 1,0$ °C и во 2-й опытной группе после размораживания образцов крови с криоконсервантом при 24-часовой инкубации при температуре $-40 \pm 1,0$ °C (табл. 4).

Результаты сравнительного анализа контрольной и 1-й опытной группы демонстрируют тенденцию к снижению большей части показателей, однако полученные значения укладываются в пределы референсных значений характеристик форменных элементов. Данные, полученные в ходе сравнительного анализа во 2-й опытной группе, демонстрируют тенденцию к снижению по всем показателям, при этом полученные значения укладываются в пределы референсных значений характеристик форменных элементов и указывают на стабильность образцов на фоне криопротекторной нагрузки.

Анализ тромбоцитарных показателей проводили в контрольной группе до внесения криоконсерванта, после его внесения и 4-часовой инкубации в 1-й опытной группе при температуре $+20 \pm 1,0$ °C и во 2-й опытной группе после размораживания образцов крови с криоконсервантом при 24-часовой инкубации при температуре $-40 \pm 1,0$ °C (табл. 5).

При сравнительном анализе показателей общего анализа крови в контрольной и 1-й опытной группах при температуре $+20 \pm 1,0$ °C выявлена тенденция к снижению уровня ряда показателей, однако все значения лежат на границе референсного диапазона. При анализе данных тромбоцитарных показателей во 2-й опытной группе наблюдается тенденция к снижению значений, однако

количественное и процентное соотношение осталось в пределах условно допустимых референсных значений характеристик форменных элементов.

Проводили анализ компьютерной цитоморфометрии тромбоцитов в контрольной группе до внесения криоконсерванта, после его внесения и 2-часовой инкубации в 1-й опытной группе при температуре $+20 \pm 1,0$ °C и во 2-й опытной группе после размораживания образцов крови с криоконсервантом при 24-часовой инкубации при температуре $-40 \pm 1,0$ °C (табл. 6).

Анализ данных в контрольной и 1-й опытной группах при температуре $+20 \pm 1,0$ °C демонстрирует тенденцию к снижению большей части показателей, однако полученные значения укладываются в пределы референсных значений характеристик форменных элементов. Данные, полученные в ходе сравнительного анализа во 2-й опытной группе, демонстрируют тенденцию к снижению уровня показателей, при этом укладываются в пределы референсных значений характеристик форменных элементов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты сравнительного анализа лейкоцитарных показателей контрольной и 1-й опытной группы с внесением криоконсерванта имели тенденцию к снижению большинства показателей, однако все значения укладывались в пределы референсного интервала. Такие показатели, как «число ядер всего — 1», «число сегментов ядра всего — 1», «число включений/дырок в ядре — 0» и «число хвостов ядра — 2», в контрольной группе и в 1-й опытной группе были идентичны. Полученные значения использовали в качестве сравнения с показателями

Таблица 4. Показатели различий компьютерной цитоморфометрии эритроцитов в группах исследований ($\bar{X} \pm m$; p)

Свойства объекта	Контрольная группа ($n = 10$)	1-я опытная группа $+20 \pm 1,0$ °C ($n = 10$)	2-я опытная группа $-40 \pm 1,0$ °C ($n = 10$)	Достоверность различия, p
Площадь клетки, мкм ²	46,6 \pm 4,12	53,3 \pm 4,68*	41,1 \pm 2,42**	$p < 0,01$
Средний диаметр, мкм	6,4 \pm 1,14	7,8 \pm 1,17	6,85 \pm 1,16	$p \geq 0,1$
Фактор формы	13,5 \pm 1,2	13,6 \pm 1,2	12,7 \pm 1,2	$p \geq 0,1$
Поляризация	0,096 \pm 1,001	0,083 \pm 0,001*	0,048 \pm 0,001**	$p < 0,01$
Интегральная оптическая плотность (Кра), мкм ²	16,4 \pm 2,78	18,1 \pm 2,91	16,2 \pm 2,74	$p \geq 0,05$
Интегральная оптическая плотность (Зел), мкм ²	20,3 \pm 2,24	21,3 \pm 2,31	19,8 \pm 2,13	$p \geq 0,1$
Интегральная оптическая плотность (Син), мкм ²	11,28 \pm 2,11	12,95 \pm 2,17	11,75 \pm 2,15	$p \geq 0,1$

Примечание: * — статистически достоверное различие между контрольной и 1-й опытной группой ($p < 0,01$); ** — статистически достоверное различие между контрольной и 2-й опытной группой ($p < 0,01$)

Таблица 5. Тромбоцитарные показатели ОАК в группах исследований ($\bar{X} \pm m$; p)

Показатели ОАК	Контрольная группа ($n = 10$)	1-я опытная группа $+20 \pm 1,0$ °C ($n = 10$)	2-я опытная группа $-40 \pm 1,0$ °C ($n = 10$)	Достоверность различия, p
PLT, $\times 10^9/\text{л}$	$230,8 \pm 5,78$	$198,6 \pm 5,36^*$	$150,1 \pm 4,71^{**}$	$p < 0,01$
MPV, фл	$8,24 \pm 1,22$	$7,56 \pm 1,24$	$7,04 \pm 1,17$	$p \geq 0,1$
PCT, %	$2,23 \pm 0,31$	$2,1 \pm 0,24$	$1,97 \pm 0,71$	$p \geq 0,1$
P-LCR, %	$17,38 \pm 2,72$	$21,24 \pm 2,61$	$19,17 \pm 2,45$	$p \geq 0,05$
P-LCC, $\times 10^9/\text{л}$	$41,61 \pm 3,12$	$50,8 \pm 3,32$	$46,14 \pm 3,74$	$p \geq 0,05$
Сохранность, %	100	$86,2 \pm 0,31^*$	$75 \pm 0,71^{**}$	$p < 0,01$

Примечание: * — статистически достоверное различие между контрольной и 1-й опытной группой ($p < 0,01$); ** — статистически достоверное различие между контрольной и 2-й опытной группой ($p < 0,01$)

образцов, подвергнутых замораживанию. При анализе данных компьютерной цитофотометрии лейкоцитарных показателей крови до и после внесения криоконсерванта при замораживании до -40 °C установлено, что во 2-й опытной группе показатели демонстрировали аналогичные значения по сравнению с группой контроля: число ядер всего — 1, число сегментов ядра всего — 1, число включений/дырок в ядре — 0 и число хвостов ядра — 2. При анализе показателей общего анализа крови и морфометрических характеристик лейкоцитов цельной крови в контрольной и опытных группах установили тенденцию к снижению их значений, однако все полученные данные не выходят за пределы допустимых значений характеристик форменных элементов. Так в контрольной группе показатели WBC — $10^9/\text{л}$ составили $5,60 \pm 0,92$ ($p < 0,01$) в 1-й опытной группе — $4,55 \pm 0,74$ ($p < 0,01$), а во 2-й опытной группе — $4,14 \pm 0,85$ ($p < 0,01$). Показатели морфометрии лейкоцитов, такие как площадь клетки в мкм^2 в контрольной группе составили $70 \pm 4,19$ ($p \geq 0,1$), в 1-й опытной группе — $59 \pm 4,75$ ($p \geq 0,1$), во 2-й опытной группе — $70 \pm 3,98$ ($p \geq 0,1$).

В полученных результатах сравнительного анализа компьютерной цитоморфометрии эритроцитов в контрольной, 1-й и 2-й опытных группах с внесением криоконсерванта имела место тенденция к снижению уровня показателей, однако все значения укладывались в пределы референсного интервала. Анализ компьютерной цитоморфометрии эритроцитов во 2-й опытной группе с криоконсервантом при температуре замораживания -40 °C показал тенденцию к снижению, однако полученные результаты указывают на стабильность образцов и укладываются в пределы референсных значений характеристик форменных элементов крови. Так в контрольной группе RBC $\times 10^{12}/\text{л}$ составили $4,62 \pm 0,23$ ($p \geq 0,05$), в 1-й опытной группе — $4,08 \pm 0,21$ ($p \geq 0,05$), во 2-й опытной группе — $3,5 \pm 0,55$ ($p \geq 0,05$). Показатели морфометрии эритроцитов, такие как площадь клетки в мкм^2 , в контрольной группе составили $46,6 \pm 4,12$ ($p < 0,01$),

в 1-й опытной группе — $53,3 \pm 4,68$ ($p < 0,01$) и 2-й опытной группе — $41,1 \pm 2,42$ ($p < 0,01$) соответственно.

По результатам сравнительного анализа уровни большинства тромбоцитарных показателей в контрольной группе и в 1-й опытной группе с криоконсервантом в условиях комнатной температуры имели тенденцию к снижению, однако все значения укладывались в пределы референсных значений характеристик форменных элементов. При анализе тромбоцитарных показателей во 2-й опытной группе с криоконсервантом при инкубации при температуре -40 °C установлено, что количественное и процентное соотношение показателей имеет тенденцию к снижению, однако полученные значения укладываются в пределы референсных значений характеристик форменных элементов крови. Так уровень PLT $\times 10^9/\text{л}$ в контрольной группе составил $230,8 \pm 5,78$ ($p < 0,01$), в 1-й опытной группе — $198,6 \pm 5,36$ ($p < 0,01$), во 2-й опытной группе — $150,1 \pm 4,71$ ($p < 0,01$). Показатели морфометрии эритроцитов, такие как площадь клетки в мкм^2 в контрольной группе составили $7,7 \pm 0,21$ ($p \geq 0,1$), в 1-й опытной группе — $7,5 \pm 0,36$ ($p \geq 0,1$), во 2-й опытной группе — $7,2 \pm 0,31$ ($p \geq 0,1$) соответственно.

По результатам анализа исследований, посвященных поиску новых эффективных криоконсервантов, большое количество работ посвящено криоконсервированию эритроцитов, нежели тромбоцитов и лейкоцитов. При использовании в качестве криоконсерванта раствора «Криосин» сохранность эритроцитов составила $83,8 \pm 4,09\%$ [24]. При оценке жизнеспособности ядросодержащих клеток в лейкоконцентратах на этапах их получения, замораживания и декриоконсервирования были получены следующие данные: в результате отмывания от ДМСО в жизнеспособном состоянии сохраняется существенно больше клеток, чем без отмывания — $94,4\%$ против $86,7\%$ [25]. При замораживании тромбоцитов крови доноров под защитой комбинированного криоконсерванта сохранялась их функциональная активность в пределах $63,5$ – $88,8\%$ [26]. Таким образом,

Таблица 6. Показатели компьютерной цитоморфометрии тромбоцитов в группах исследований ($\bar{X} \pm m$; p)

Свойства объекта	Контрольная группа ($n = 10$)	1-я опытная группа $+20 \pm 1,0$ °C ($n = 10$)	2-я опытная группа $-40 \pm 1,0$ °C ($n = 10$)	Достоверность различия, p
Площадь, мкм^2	$7,7 \pm 0,21$	$7,5 \pm 0,36$	$7,2 \pm 0,31$	$p \geq 0,1$
Мин. диаметр, мкм	$2,85 \pm 0,14$	$2,63 \pm 0,16$	$2,31 \pm 0,24$	$p \geq 0,1$
Макс. диаметр, мкм	$4,03 \pm 0,24$	$3,94 \pm 0,32$	$3,74 \pm 0,36$	$p \geq 0,1$
Средний диаметр, мкм	$3,44 \pm 0,13$	$3,29 \pm 0,16^*$	$3,03 \pm 0,21^{**}$	$p < 0,01$
Фактор формы	$12,9 \pm 2,18$	$12,3 \pm 1,21$	$12,1 \pm 1,74$	$p \geq 0,05$

Примечание: * — статистически достоверное различие между контрольной и 1-й опытной группой ($p < 0,01$); ** — статистически достоверное различие между контрольной и 2-й опытной группой ($p < 0,01$)

данные, полученные в ходе настоящего исследования, сопоставимы с результатами литературных данных по анализу сохранности отдельных форменных элементов крови в ходе криоконсервирования.

Разработанный криоконсервант с лактулозой является эффективным в условиях замораживания до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и доступным (все компоненты производятся на территории Российской Федерации), что расширяет спектр применяемых криоконсервантов и позволит провести анализ морфофункциональных параметров образцов замороженной цельной крови при крупномасштабных исследованиях в условиях чрезвычайных ситуаций, при ликвидации последствий аварий техногенного или природного происхождения, террористических актов, вооруженных конфликтов, хранения биоматериала в длительных экспедициях и отдаленных местностях. Кроме того, перспективен персонализированный подход к трансфузии компонентов крови при экстренной необходимости переливания собственной криоконсервированной цельной крови для снижения

риска влияния чужеродных комплексов на организм реципиента. Представленные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения влияния лактулозы в качестве криокомпонента на сохранность биообъектов.

ВЫВОДЫ

В ходе обработки полученных данных выявлена морфологическая и функциональная сохранность форменных элементов крови в разработанном криоконсерванте с лактулозой после замораживания в течение 24 ч при температуре $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$: для эритроцитов — $85,3 \pm 0,30\%$ ($p < 0,05$), для тромбоцитов — $75 \pm 0,71\%$ ($p < 0,05$), для лейкоцитов — $90,1 \pm 0,91\%$ ($p < 0,05$) от значений, зарегистрированных до замораживания. В свете современных исследований, посвященных поиску новых эффективных криоконсервантов, лактулоза может найти применение в качестве нетоксичного компонента при разработке криосоставов для сохранения биологических объектов при замораживании.

Литература

- Hidi L, Komorowicz E, Kovács GI, Szeberin Z, Garbaisz D, Nikolova N, et al. Cryopreservation moderates the thrombogenicity of arterial allografts during storage. *PLoS One*. 2021; 16 (7): e0255114. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255114>.
- Bojic S, Murray A, Bentley BL, Spindler R, Pawlik P, Cordeiro JL, et al. Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biol* 19. 2021; 56. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00976-8>.
- Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative medicine*. 2020; 15 (3): 1463–91. DOI: 10.2217/rme-2019-0145.
- Liu X, Pan Y, Liu F, He Y, Zhu Q, Liu Z, et al. A review of the material characteristics, antifreeze mechanisms, and applications of cryoprotectants (CPAs). *Journal of Nanomaterials*. 2021; 2021. Available from: doi.org/10.1155/2021/9990709.
- Заикина Е. В., Гончарова А. С., Позднякова В. В., Пандова О. В., Пржедецкий Ю. В., Воловик В. Г. и др. Обзор современных методов криоконсервации различных видов биологического материала. *Современные проблемы науки и образования*. 2022; 4. Доступно по ссылке: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=31790>.
- Силокова Ю. Л., Станишевская О. И., Плешанов Н. В., Курочкин А. А. Эффективность использования комбинаций сахаридов в средах для криоконсервации спермы петухов. *Сельскохозяйственная биология*. 2020; 55 (6): 1148–58. DOI: 10.15389/agrobiologia.2020.6.1148rus.
- Jahan S, Kaushal R, Pasha R, Pineault N. Current and future perspectives for the cryopreservation of cord blood stem cells. *Transfus Med Rev*. 2021; 35 (2): 95–102. DOI: 10.1016/j.tmr.2021.01.003. PMID: 33640254.
- Tas RP, Sampaio-Pinto V, Wennekes T, van Laake LW, Voets IK. From the freezer to the clinic: Antifreeze proteins in the preservation of cells, tissues, and organs. 2021; 22 (3): 52162. DOI: 10.15252/embr.202052162. PMID: 33586846; PMCID: PMC7926221.
- Whaley D, Danyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplant*. 2021; 30: 963689721999617. DOI: 10.1177/0963689721999617. PMID: 33757335; PMCID: PMC7995302.
- Li J, Wang H, Wang L, et al. Stabilization effects of saccharides in protein formulations: A review of sucrose, trehalose, cyclodextrins and dextrans. *Eur J Pharm Sci*. 2024; 192: 106625. DOI: 10.1016/j.ejps.2023.106625. Epub 2023 Nov 2. PMID: 37918545.
- Zhong Y, McGrath JK, Gong B. Dipropionates of sugar alcohols as water-soluble, nontoxic CPAs for DMSO-Free cell cryopreservation. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021; 7 (10): 4757–62. DOI: 10.1021/acsbomaterials.1c00995. PMID: 34587440.
- Широких И. Г., Полежаева Т. В., Широких А. А., Худяков А. Н., Сергушкина М. И., Назарова Я. И. и др. Криозащитные свойства полисахаридодержащей фракции *Hericium erinaceus* БП 16. *Известия РАН. Серия биологическая*. 2020; 1: 5–11. DOI: 10.31857/S0002332920010129.
- Olsson C, Swenson J. Structural comparison between sucrose and trehalose in aqueous solution. *J Phys Chem B*. 2020; 124 (15): 3074–82. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b09701. PMID: 32223195; PMCID: PMC7311057.
- Janis BR, Priddy MC, Otto MR, Kopechek JA, Menze MA. Sonoporation enables high-throughput loading of trehalose into red blood cells. *Cryobiology*. 2021; 98: 73–79. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.12.005. PMID: 33359645.
- Xu B, Wang Z, Wang R, Song G, Zhang Y, Su R, et al. Metabolomics analysis of buck semen cryopreserved with trehalose. *Front Genet*. 2022; 13: 938622. DOI: 10.3389/fgene.2022.938622. PMID: 35991557; PMCID: PMC9386307.
- Yao J, Shen L, Chen Z, Zhang B, Zhao G. Hydrogel microencapsulation enhances cryopreservation of red blood cells with trehalose. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022; 8 (5): 2066–75. DOI: 10.1021/acsbomaterials.2c00051. PMID: 35394755.
- Murray A, Congdon TR, Tomás RMF, Kilbride P, Gibson MI. Red blood cell cryopreservation with minimal post-thaw lysis enabled by a synergistic combination of a cryoprotecting polyampholyte with DMSO/Trehalose. *Biomacromolecules*. 2022; 23 (2): 467–77. DOI: 10.1021/acs.biomac.1c00599. PMID: 34097399; PMCID: PMC7612374.
- Рябцева С. А., Храмов А. Г., Будкевич Р. О., Анисимов Г. С., Чулко А. О., Шпак М. А. Физиологические эффекты, механизмы действия и применение лактулозы. *Вопросы питания*. 2020; 89 (2): 5–20. DOI: 10.24411/0042-8833-2020-10012.
- Shpak M, Ryabtseva S, Bratsikhin A. Lactulose effect on viability of starter cultures. *Journal of Hygienic Engineering and Design*. 2019; 27: 162–7.
- Killer J, Bunešová VN, Modráčková N, Vlková E, Pechar R, Špířchal I. Lactulose in combination with soybean lecithin has a cryoprotective effect on probiotic taxa of bifidobacteria and Lactobacillaceae. *Lett Appl Microbiol*. 2023; 76 (2): ovad008. DOI: 10.1093/lambio/ovad008. PMID: 36657381.
- Dayal R, Beyls E, Vral A, et al. The micronucleus assay on cryopreserved whole blood. *J Vis Exp*. 2024; 204. DOI: 10.3791/65855. PMID: 38465937.

22. Blackwell AD, Garcia AR, Keivanfar RL, et al. A field method for cryopreservation of whole blood from a finger prick for later analysis with flow cytometry. *Am J Phys Anthropol.* 2021; 174 (4): 670–85. DOI: 10.1002/ajpa.24251. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33595836.
23. Кит О. И., Гненная Н. В., Филиппова С. Ю., Чембарова Т. В., Лысенко И. Б., Новикова И. А. и др. Криоконсервация гемопоэтических стволовых клеток периферической крови в трансплантологии: современное состояние и перспективы. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2023; 22 (11): 3691. DOI: 10.15829/1728-8800-2023-3691. EDN YTCCTM.
24. Кирьянова Г. Ю., Волкова С. Д., Касьянов А. Д., Гришина Г. В., Голованова И. С., Чечеткин А. В. Криоконсервирование эритроцитов при температурах -40°C и -80°C . *Вестник международной академии холода.* 2017; 1: 72–78. DOI: 10.21047/1606-4313-2017-16-1-72-78.
25. Исаева Н. В., Минаева Н. В., Утемов С. В., Шерстнев Ф. С., Зорина Н. А., Змеева Ю. С. и др. Жизнеспособность ядросодержащих клеток в лейкоконцентратах на этапах их получения, замораживания и декриоконсервирования. *Бюллетень сибирской медицины.* 2023; 22 (2): 46–52. Available from: <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-46-52>.
26. Ветошкин К. А., Утемов С. В., Шерстнев Ф. С., Князев М. Г., Костяев А. А. Результаты криоконсервирования донорских тромбоцитных концентратов при низких и ультранизких температурах. *Трансфузиология.* 2015. 2 (16): 22–27.

References

1. Hidi L, Komorowicz E, Kovács GI, Szeberin Z, Garbaisz D, Nikolova N, et al. Cryopreservation moderates the thrombogenicity of arterial allografts during storage. *PLoS One.* 2021; 16 (7): e0255114. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255114>.
2. Bojic S, Murray A, Bentley BL, Spindler R, Pawlik P, Cordeiro JL, et al. Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biol.* 2021; 56. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00976-8>.
3. Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative medicine.* 2020; 15 (3): 1463–91. DOI: 10.2217/rme-2019-0145.
4. Liu X, Pan Y, Liu F, He Y, Zhu Q, Liu Z, et al. A review of the material characteristics, antifreeze mechanisms, and applications of cryoprotectants (CPAs). *Journal of Nanomaterials.* 2021; 2021. Available from: doi.org/10.1155/2021/9990709.
5. Zaikina EV, Goncharova AS, Pozdnyakova VV, Pandova OV, Przhedekij YuV, Volovik V. G, et al. Обзор современных методов криоконсервации различных видов биологического материала. *Современные проблемы науки и образования.* 2022; 4. Доступно по ссылке: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=31790>. Russian.
6. Silyukova YuL, Stanishevskaja OI, Pleshchanov NV, Kurochkin AA. Jeftektivnost' ispol'zovaniya kombinacij saharidov v sredah dlja kriokonservacii spermy petuhov. *Sel'skohozjajstvennaja biologija.* 2020; 55 (6): 1148–58. DOI: 10.15389/agrobiologija.2020.6.1148rus. Russian.
7. Jahan S, Kaushal R, Pasha R, Pineault N. Current and future perspectives for the cryopreservation of cord blood stem cells. *Transfus Med Rev.* 2021; 35 (2): 95–102. DOI: 10.1016/j.tmv.2021.01.003. PMID: 33640254.
8. Tas RP, Sampaio-Pinto V, Wennekes T, van Laake LW, Voets IK. From the freezer to the clinic: Antifreeze proteins in the preservation of cells, tissues, and organs. 2021; 22 (3): 52162. DOI: 10.15252/embr.202052162. PMID: 33586846; PMCID: PMC7926221.
9. Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplant.* 2021; 30: 963689721999617. DOI: 10.1177/0963689721999617. PMID: 33757335; PMCID: PMC7995302.
10. Li J, Wang H, Wang L, et al. Stabilization effects of saccharides in protein formulations: A review of sucrose, trehalose, cyclodextrins and dextrans. *Eur J Pharm Sci.* 2024; 192: 106625. DOI: 10.1016/j.ejps.2023.106625. Epub 2023 Nov 2. PMID: 37918545.
11. Zhong Y, McGrath JK, Gong B. Dipropionates of sugar alcohols as water-soluble, nontoxic CPAs for DMSO-free cell cryopreservation. *ACS Biomater Sci Eng.* 2021; 7 (10): 4757–62. DOI: 10.1021/acsbmaterials.1c00995. PMID: 34587440.
12. Shirokih IG, Polezhaeva TV, Shirokih AA, Hudyakov AN, Serghushkina MI, Nazarova Yal, et al. Kriozashhitnye svojstva polisaharidsoderzhashhej frakcii *Heridium erinaceus* BP 16. *Izvestija RAN. Serija biologicheskaja.* 2020; 1: 5–11. DOI: 10.31857/S0002332920010129. Russian.
13. Olsson C, Swenson J. Structural comparison between sucrose and trehalose in aqueous solution. *J Phys Chem B.* 2020; 124 (15): 3074–82. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b09701. PMID: 32223195; PMCID: PMC7311057.
14. Janis BR, Priddy MC, Otto MR, Kopechek JA, Menze MA. Sonoporation enables high-throughput loading of trehalose into red blood cells. *Cryobiology.* 2021; 98: 73–79. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.12.005. PMID: 33359645.
15. Xu B, Wang Z, Wang R, Song G, Zhang Y, Su R, et al. Metabolomics analysis of buck semen cryopreserved with trehalose. *Front Genet.* 2022; 13: 938622. DOI: 10.3389/fgene.2022.938622. PMID: 35991557; PMCID: PMC9386307.
16. Yao J, Shen L, Chen Z, Zhang B, Zhao G. Hydrogel microencapsulation enhances cryopreservation of red blood cells with trehalose. *ACS Biomater Sci Eng.* 2022; 8 (5): 2066–75. DOI: 10.1021/acsbmaterials.2c00051. PMID: 35394755.
17. Murray A, Congdon TR, Tomás RMF, Kilbride P, Gibson MI. Red blood cell cryopreservation with minimal post-thaw lysis enabled by a synergistic combination of a cryoprotecting polyampholyte with DMSO/Trehalose. *Biomacromolecules.* 2022; 23 (2): 467–77. DOI: 10.1021/acs.biomac.1c00599. PMID: 34097399; PMCID: PMC7612374.
18. Ryabceva SA, Hramcov AG, Budkevich RO, Anisimov GS, Chuklo AO, Shpak MA. Fiziologicheskie jeffekty, mehanizmy dejstvija i primenenie laktulozy. *Voprosy pitanija.* 2020; 89 (2): 5–20. DOI: 10.24411/0042-8833-2020-10012. Russian.
19. Shpak M, Ryabtseva S, Bratsikhin A. Lactulose effect on viability of starter cultures. *Journal of Hygienic Engineering and Design.* 2019; 27: 162–7.
20. Killer J, Bunešová VN, Modráčková N, Vlková E, Pechar R, Šplíchal I. Lactulose in combination with soybean lecithin has a cryoprotective effect on probiotic taxa of bifidobacteria and Lactobacillaceae. *Lett Appl Microbiol.* 2023; 76 (2): ovad008. DOI: 10.1093/lambio/ovad008. PMID: 36657381.
21. Dayal R, Beyls E, Vral A, et al. The micronucleus assay on cryopreserved whole blood. *J Vis Exp.* 2024; 204. DOI: 10.3791/65855. PMID: 38465937.
22. Blackwell AD, Garcia AR, Keivanfar RL, et al. A field method for cryopreservation of whole blood from a finger prick for later analysis with flow cytometry. *Am J Phys Anthropol.* 2021; 174 (4): 670–85. DOI: 10.1002/ajpa.24251. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33595836.
23. Кит ОИ, Гненная НВ, Филиппова СЮ, Чембарова ТВ, Лысенко ИБ, Новикова ИА, et al. Криоконсервация гемопоэтических стволовых клеток периферической крови в трансплантологии: современное состояние и перспективы. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2023; 22 (11): 3691. DOI: 10.15829/1728-8800-2023-3691. EDN YTCCTM. Russian.
24. Кирьянова ГЮ, Волкова СД, Касьянов АД, Гришина ГВ, Голованова ИС, Чечеткин АВ. Криоконсервирование эритроцитов при температурах -40°C и -80°C . *Вестник международной академии холода.* 2017; 1: 72–78. DOI: 10.21047/1606-4313-2017-16-1-72-78. Russian.
25. Isaeva NV, Minaeva NV, Utemov SV, Sherstnev FS, Zorina NA, Zmeeva YuS, et al. Zhiznesposobnost' jadrosoderzhashhih kletok v lejkokoncentratah na etapah ih poluchenija, zamorazhivaniya i dekriokonservirovaniya. *Bjulleten' sibirskoj mediciny.* 2023; 22 (2): 46–52. Available from: <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-46-52>. Russian.
26. Vetoshkin KA, Utemov SV, Sherstnev FS, Knyazev MG, Kostjaev AA. Rezul'taty kriokonservirovaniya donorskih trombocitnyh koncentratov pri nizkih i ul'tranizkih temperaturah. *Transfuziologija.* 2015. 2 (16): 22–27. Russian.